



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE TREMOR EPIZOÓTICO EM PORTUGAL

ANA CATARINA DA SILVA BARRETO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da
Silva

Doutora Maria Leonor dos Santos Diniz
Orge

ORIENTADORA

Doutora Maria Leonor dos
Santos Diniz Orge

CO-ORIENTADOR

Doutor José Manuel Antunes
Ferreira da Silva

2014
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE TREMOR EPIZOÓTICO EM PORTUGAL

ANA CATARINA DA SILVA BARRETO

TESE DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor José Manuel Antunes Ferreira
da Silva

Doutora Maria Leonor dos Santos
Diniz Orge

ORIENTADORA

Doutora Maria Leonor dos
Santos Diniz Orge

CO-ORIENTADOR

Doutor José Manuel Antunes
Ferreira da Silva

2014
LISBOA

Agradecimentos

Agradeço à Kippy.

Agradeço ao Franz.

Agradeço à Doutora Leonor Orge, às técnicas Alice Santos e Sandra Fernandes pelo eficiente trabalho.

Agradeço ao amigo Henrique o apoio técnico.

Agradeço ao Prof. Doutor Ferreira da Silva pela prestabilidade.

Estudo retrospectivo sobre Tremor Epizoótico em Portugal

Resumo

O tremor epizoótico (TE) é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET) que ocorre naturalmente em ovinos, caprinos e muflões. É uma doença conhecida há mais de 250 anos. Caracteriza-se pela acumulação da isoforma patológica- proteína priónica resistente (PrP^{res} ou PrP^{sc}) de uma proteína fisiológica do hospedeiro- proteína priónica celular (PrP^c) no sistema nervoso central, conduzindo à progressiva neurodegeneração e morte. O tremor epizoótico ou *scrapie*, representa o protótipo das doenças priónicas. Existem dois tipos de *scrapie* classificados até à data, o *scrapie* clássico e o *scrapie* atípico/Nor98. A suscetibilidade a qualquer dos tipos de *scrapie* é determinada por polimorfismos do gene priónico.

O *scrapie* clássico é uma doença infecciosa sendo que o *scrapie* atípico/Nor98 é visto como uma doença de ocorrência esporádica e dependente da mudança espontânea de conformação da proteína priónica. O tipo de *scrapie* mais prevalente em Portugal é o *scrapie* atípico/Nor98. Assim, elaborou-se o presente estudo retrospectivo com o intuito de determinar o potencial de ocorrência de *scrapie* no nosso país entre 1995 e 2002, examinando, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), amostras de tecido nervoso de pequenos ruminantes arquivadas no Laboratório de Patologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), e contribuir para a caracterização epidemiológica desta doença no nosso país.

Palavras-chave Tremor Epizoótico, *Scrapie* atípico, *Scrapie* clássico, Prião, EETs.Portugal, Imunohistoquímica.

Retrospective study on scrapie in Portugal

Abstract

Scrapie is naturally occurring transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in sheep, goat and mufflons almost worldwide and it is known for about 250 years. It is characterized by the accumulation of an abnormal isoform- resistant prion protein (PrP^{res} or PrP^{sc}) of host encoded prion protein- cellular prion protein (PrP^c) in the central nervous system leading to progressive neurodegeneration and death. Scrapie represents the prototype of the so-called prion diseases. It is observed to date as two types, classical and atypical/Nor98 scrapie. The susceptibility to both types is modulated by polymorphisms of the prion gene.

Whereas classical scrapie is clearly a naturally occurring transmissible disease, atypical scrapie seems to be caused by spontaneous misfolding of prion protein. The most prevalent type of scrapie in Portugal is the atypical/Nor 98 strain.

This retrospective study intends to find out the potential occurrence of scrapie in Portugal before 2002, examining through imunohistochemistry (IHC) samples of small ruminants archived from 1995 to 2002 in the Pathology laboratory from INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – The National Institute for Agricultural and Veterinary Research), contributing to the epidemiological characterization of the disease in this country.

Keywords **Atypical** Classical *scrapie*, Atypical *scrapie*, Prion, TSE, Portugal, Imunohistochemistry.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vi
Abreviaturas e Siglas	vii
Parte I. Revisão Bibliográfica	
1. Introdução	1
1.1. <i>Scrapie</i> – nota histórica	1
1.2. Sinais clínicos do <i>scrapie</i>	3
1.3. Etiologia - hipótese do prião	4
1.3.1. Características da proteína priónica	5
1.3.2. Visualização da proteína priónica	7
1.3.3. A infecção pela PrP ^{Sc} : mecanismos moleculares	8
1.3.4. Função biológica da PrP ^c	12
1.4. Formas de <i>scrapie</i>	13
1.4.1. Sinais clínicos do <i>scrapie</i> atípico/Nor98 em ovinos	15
1.4.2. Distribuição da PrP ^{Sc} no <i>scrapie</i> atípico/Nor98	17
1.4.3. Epidemiologia do <i>scrapie</i> atípico/Nor98	18
1.4.4. A genética da PrP ^{Sc} associada ao <i>scrapie</i> atípico/Nor98	20
1.4.5. Transmissão e Patogenia de <i>scrapie</i> atípico/Nor98	23
1.4.6. Ocorrência de <i>scrapie</i> atípico/Nor98 antes de 1998	24
1.4.7. A situação de Portugal	26
1.4.8. Estratégias de controlo	27
2. Parte II. Trabalho Experimental	
2.1. Objetivos	28
2.2. Material e Métodos	28
2.2.1. Caracterização da amostragem	28
2.2.2. A técnica de Imunohistoquímica (IHQ)	29
2.2.3. Condições de Leitura	31
2.3. Resultados	32
2.4. Discussão	47
2.5. Conclusão	49
3. Bibliografia	50
4. Anexos	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Formação da PrP ^{sc} segundo Prusiner (1992).	8
Figura 2 - Imunohistoquímica para a PrP ^{sc} usando mAb anticorpo F89/160.1.5 em dois casos de <i>scrapie</i> atípico/Nor98 na Noruega (Benestad et al., 2008).	18
Figura 3 – Controlo negativo (análise 15593/08 do 2º ensaio).	37
Figura 4a - Controlo positivo- cerebelo (análise 32458/10 controlo do 17º ensaio).	37
Figura 4b - Controlo positivo – camada molecular do cerebelo (análise 32458/10 controlo do 17º ensaio).	38
Figura 4c – Controlo positivo- camada molecular do cerebelo (análise 32458/10 controlo do 17º ensaio) - pormenor de 4b.	38
Figura 4d – Controlo positivo- cerebelo, substância branca (análise 32458/10 controlo do 17º ensaio).	39
Figura 5 – Controlo positivo- cerebelo, camada granulosa (análise 13026/08 controlo do 2º ensaio).	39
Figura 6 – Artefactos de congelação – substância branca ao nível córtex cerebral (análise 3863/95).	40
Figura 7a - Artefactos de marcação no cerebelo (análise 1546/96).	40
Figura 7b - Artefactos de marcação observados noutra área da secção de 7a (análise 1546/96 cerebelo).	41
Figura 8 – Imunomarcação no cerebelo do ovino 1546/96.	41
Figura 9a – Imunomarcação no cerebelo do ovino 2219/99.	42
Figura 9b – Partículas de imunomarcação noutra área de observação da secção do cerebelo do ovino 2219/99.	42
Figura 10a – Dispersa imunomarcação em partículas na camada molecular do cerebelo do ovino 2475/99.	43
Figura 10b - – Camada molecular do cerebelo do ovino 2475/99. Pormenor da figura 10a.	43
Figura 11a – Imunomarcação em grânulos na camada granulosa do cerebelo do ovino 10884/99.	44
Figura 11b – Camada granulosa do cerebelo do ovino 10884/99. Pormenor da figura 11a.	44
Figura 12a – Imunomarcação no córtex cerebral do ovino 11511/99.	45
Figura 12b – Córtex cerebral do ovino 11511/99. Outra área da secção da figura 12a.	45
Figura 13 – Imunomarcação em linhas no córtex cerebral do ovino 10884/99.	46
Figura 14 – Imunomarcação na substância branca do cerebelo do ovino 1546/96.	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	2
Tabela 2 - Designação para o <i>scrapie</i> consoante os diferentes países	3
Tabela 3 - Isoformas fisiológica PrP ^c e patológica PrP ^{sc}	7
Tabela 4 - Designação das proteínas priónicas de mamíferos de acordo com a forma de doença	11
Tabela 5 - Priões Fúngicos	12
Tabela 6 - Categorização das TSEs em pequenos ruminantes- adaptação da EFSA (2005)	14
Tabela 7 - Forma de morte de ovinos consoante o tipo de <i>scrapie</i> na Alemanha (Lühken et al., 2007)	16
Tabela 8 - Idade de ovinos positivos para os diferentes tipos de <i>scrapie</i> na Alemanha (Lühken et al., 2007)	19
Tabela 9 - Animais positivos para os diferentes tipos de <i>scrapie</i> em rebanhos na Alemanha (Lühken et al., 2007)	20
Tabela 10 - Genótipos da PrP ^{sc} associada ao <i>scrapie</i> atípico/Nor98	21
Tabela 11 - Número de animais testados por imunohistoquímica (IHC) entre 1980 e 1989 no Reino Unido. (Webb et al., 2009)	25
Tabela 12 – Descrição geográfica da amostragem de acordo com a DRA de origem	29
Tabela 13 - Identificação das amostras e resultados obtidos em cada ensaio de Imunohistoquímica	34
Tabela 14 – Descrição da amostragem utilizada neste estudo retrospectivo	55

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E DE SÍMBOLOS

ABC- *Avidin-biotin-complex* – Complexo avidina-biotina
BSE – *Bovine Spongiform Encephalopathy*- Encefalopatia espongiforme bovina
CJD- *Creutzfeld-Jacob-Disease*- Doença de Creutzfeld-Jacob
CWD – *Chronic Wasting Disease*, Doença emaciante crónica
DAB-Diaminobenzidina
DMNV- *Dorsal motor nucleus of vague nerve*- núcleo motor dorsal do nervo vago
DRA- Direcção geral de agricultura
EEB- Encefalopatia espongiforme bovina
EET – Encefalopatia espongiforme transmissível
EFSA- *European Food Safety Agency*- Autoridade europeia para a segurança alimentar
fCJD – *Familial Creutzfeld-Jacob-Disease*- doença de Creutzfeld-Jacob familiar
FFI – *Fatal Familial Insomnia*- insónia familiar fatal
FSE – *Feline Spongiform Encephalopathy*- encefalopatia espongiforme felina
GSS – *Gertsmann- Sträussler –Scheinker*
iCJD – *Iatrogenic Creutzfeld-Jacob-Disease*- doença de Creutzfeld-Jacob iatrogénica
IHQ-Imunohistoquímica
INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IPAC- Instituto Português de Acreditação
MAb- *Monoclonal antibody*- anticorpo monoclonal
min-minuto
Prion – Proteinaceous infectious particle
pnrp-Gene que codifica a PrP^c
PrP^c- Proteína priónica celular
PrP^{sc}- Proteína priónica resistente
sCJD – *Sporadic Creutzfeld-Jacob-Disease*- doença de Creutzfeld-Jacob esporádica
sFI – *Sporadic Familial Insomnia*-insónia esporádica fatal
SNC- Sistema Nervoso Central
SNP- Sistema Nervoso Periférico
TE – Tremor Epizoótico
TME – *Transmissible Mink Encephalopathy*- Encefalopatia espongiforme do visão
TBS- *TRIS Buffer saline*- tampão TRIS (trishidroximetilaminometano) salino
TSE – *Transmissible Spongiform Encephalopathy*-encefalopatia espongiforme transmissível
vCJD- *Variant Creutzfeld-Jacob-Disease*- variante da doença de Creutzfeld-Jacob
v/v- volume-volume

PARTE I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.Introdução

O *scrapie* ou Tremor Epizoótico (TE) é a Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET ou TSEs, sigla da terminologia anglo-saxónica Transmissible Spongiform Encephalopathy) mais antiga e a mais ubíqua das doenças priónicas conhecidas até hoje. O *scrapie* foi pela primeira vez descrito em 1732 (Stockman, 1913). Os dados apontam para a sua ocorrência relativamente esporádica e consistentemente de baixa incidência. Durante mais de dois séculos permaneceu como curiosidade científica até que a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB ou BSE, da terminologia anglo-saxónica Bovine Spongiform Encephalopathy) surgiu em 1985 e o interesse pelas TSEs cresceu notavelmente. Em 1996 é estabelecida a relação entre a BSE e a variante humana da doença de Creutzfeldt-Jacob, uma encefalopatia neurodegenerativa causada pela ingestão de alimentos contaminados com produtos infetados com proteína priónica bovina. A partir de então aumenta a atenção pública para as TSEs de forma exponencial.

1.1.Scrapie – nota histórica

O termo “encefalopatia espongiforme transmissível” (EET ou TSE) é usado para nos referirmos a um conjunto de doenças neurodegenerativas fatais que afetam diferentes mamíferos entre os quais o homem. As TSE que afetam o homem incluem a doença de Creutzfeldt-Jacob, a síndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker (GSS), a Kuru, a insónia familiar fatal (FFI, Fatal Familiar Insomnia) e a insónia familiar esporádica (sFI, Sporadic Fatal Insomnia). As TSEs que afetam mamíferos não humanos são o *scrapie* clássico e atípico em ovinos e caprinos, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), a encefalopatia transmissível do visão (TME, Transmissible Mink Encephalopathy), a doença emaciante crónica dos cervídeos (CWD, Chronic Wasting Disease), a encefalopatia espongiforme felina (FSE, Feline Spongiform Encephalopathy), e a encefalopatia dos ungulados exóticos (Tabela 1) (Schneider, Fangerau & Michaelsen, 2008).

Precedentemente, as pessoas mais interessadas em *scrapie* eram os produtores de ovinos que eram diretamente afetados economicamente pela doença. Desde então, e com a possibilidade da transmissão das TSE ao homem, aquele interesse atingiu a comunidade científica.

Tabela1 - Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis por ano de identificação

Espécie afetada	Encefalopatia	Ano de Identificação
Ovinos, caprinos, muflões	<i>Scrapie Clássico</i>	1732
Homem	Kuru	1900
Homem	Doença de Creutzfeldt-Jacob esporádica (sCJD)	1920
Homem	Síndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker (GSS)	1926
Homem	Doença de Creutzfeldt-Jacob familiar (fCJD)	1930
Visão	Encefalopatia Transmissível do Visão (TME)	1947
Cervídeos	Doença Emaciante Crónica (CWD)	1967
Homem	Doença de Creutzfeldt-Jacob iatrogénica (iCJD)	1974
Bovinos	Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE)	1985
Nyala, oryx, kudu	Encefalopatia Espongiforme dos Ungulados Exóticos	1986
Homem	Insónia familiar fatal (FFI)	1986
Gato	Encefalopatia Espongiforme Felina (FSE)	1990
Homem	Variante da doença de Creutzfeldt-Jacob (vCJD)	1996
Ovinos e caprinos	<i>Scrapie Atípico</i>	1998
Homem	Insónia familiar esporádica (sFI)	1999

(adaptado de Orge, 2005)

O *scrapie* conhece diferentes nomes consoante os diferentes países onde surge, geralmente relacionados com os sinais clínicos observados (Tabela 2):

Tabela 2 - Designação para o *scrapie* consoante os diferentes países

Nome para o <i>scrapie</i>	País
Cuddie Trot, Scratchie, Yeukie pine	Escócia
Doença de Basquilla, Prurigo lumbar	Espanha
Drab(en), Dreb/Deeb, Drehkrankheit, Gaubber/Gnauper, Gnuberkrankheit, Knopper, Knupper, Kreutzschlagen, Petermannchen, Reiberkrankheit, Reiber-Uebel Ruppe, Scabies dorsales, Schrucken, Spruckigkeit, Tempermanner, Traberkrankheit, Wetzkrankheit, Zitterkrankheit	Alemanha
Goggles, Rickets, Rub/Rubbers, Rubbing disease, Shakings, Schrewcroft, Shrugginess, Trotting disease	Inglaterra
Khujali, Mukoo	Índia
La maladie convulsive, La maladie folle, La maladie troteurs, La prurigo lombaire, La tremblante	França
Rida	Islândia
Trzęsawka	Polónia
Tremor epizoótico	Portugal

1.2. Sinais clínicos do *scrapie*

Há uma mudança geral no comportamento e temperamento semanas antes de sinais mais específicos surgirem, embora nalguns casos a condição de um animal afetado poder piorar rapidamente ou ocorrer a morte súbita. Os animais com *scrapie* apresentam o conjunto de sinais que se seguem, embora o prurido seja menos evidente no *scrapie* atípico. Nenhum dos sinais seguintes define o *scrapie* por si só (DEFRA, Agricultural Departments of Great Britain, 2009).

Mudanças no comportamento

- Excitabilidade;
- Orelhas caídas;
- Nervosismo aumentado;
- Ficar para trás em relação ao rebanho;

- Agressividade;
- Depressão

Prurido

- Roçar repetidamente a cabeça e o corpo contra objetos como cercas, postes e prateleiras de feno;
- Roçar repetidamente os flancos;
- Mordiscar ou ranger os dentes enquanto se roçam ou quando friccionados com firmeza no dorso;
- Coçar repetidamente o ombro ou as orelhas com o membro pélvico. Mordiscar as extremidades, os membros pélvicos ou outras partes do corpo;
- Perda excessiva de lã ou lesões cutâneas.

Mudanças na postura e no movimento

- Tremor principalmente da cabeça;
- Marcha anormal com levantar excessivo do membro (hipermetria);
- Descoordenação motora severa;
- Tropeçar;
- Estação anormal;
- Membros posteriores débeis;
- Incapacidade para suportar o próprio peso.

Sinais clínicos tardios

- Perda de peso;
- Decúbito permanente;
- Morte.

1.3. Etiologia - hipótese do prião

Durante o século XX, surgem diferentes teorias acerca da etiologia das TSE. Assim, diferentes agentes foram apontados, sendo denominados por ordem cronológica:

- Sarcosporoidia (1914)
- Um vírus filtrável (1938)
- Um lentivírus (1954)
- Um polissacarídeo replicável (1966)
- Uma proteína (1967)
- Um fragmento de membrana replicável (1967)
- Um complexo de polissacáridos de DNA (1968)

- Um viroide (1972)
- Um lípido (1978)
- *Spiroplasma sp* (1979)
- Um virino (1979)
- Um prião (1982)
- Um vírus (1984)
- Ácidos nucleicos mitocondriais (1989)
- Um holoprião, PrP^{sc} (PrP^c na conformação não patológica do *scrapie*, o apoprião) e um ácido nucleico (dispensável), o coprião. (1991)

Inicialmente, pensou-se que o agente causador das TSEs fosse um vírus, apesar de possuir características muito diferentes da maioria das famílias de vírus conhecidas e de nunca ter sido observado ao microscópio electrónico. A designação de vírus lentos surgiu por se verificar que originavam doenças com um período de incubação muito longo. Exibiam também outras diferenças como a impossibilidade de detecção de ácidos nucleicos e a resistência a muitos agentes virucidas. Griffith, em 1967, propõe a existência de um novo agente, exclusivamente proteico e com capacidade replicativa. Prusiner, em 1982, retoma a hipótese ao isolar e purificar o agente a partir de tecido cerebral de hamster infetado e denomina-o prião – acrónimo de *small proteinaceous infectious particles*.

A prova da inexistência de qualquer material genético nas proteínas priónicas é dada por observações de que permanecem ativas mesmo após tratamentos eficazes na degradação de ácidos nucleicos, como a exposição a radiações ionizantes e ultravioletas, ou a incubação em presença de nucleases. Como também não provocam resposta inflamatória ou imunitária específicas, o diagnóstico baseia-se na detecção da proteína priónica nos tecidos em exames *post-mortem*. A observação de que o prião não provoca qualquer resposta imunitária induz que se trata de uma proteína fisiológica do cérebro e outros tecidos que, em certas circunstâncias, perde a sua função normal por alteração da sua conformação (Westergard, Christensen & Harris, 2007).

1.3.1. Características da proteína priónica

O prião apresenta elevada resistência aos métodos de desinfeção e esterilização mais comumente utilizados, sendo dificilmente inativado. A inativação é alcançada por incubação a 20°C, durante 1 hora com hipoclorito de sódio a 20000 ppm, ou por autoclavagem a uma temperatura superior a 134°C, durante 1 hora à pressão de 3 atm (Donne et al., 1997).

A proteína priónica é codificada por um gene presente na maioria das espécies de mamíferos. Apresenta duas isoformas – a isoforma fisiológica- proteína priónica celular (PrP^c) e a isoforma patológica- proteína priónica resistente (PrP^{res} ou PrP^{sc}). A primeira, a isoforma normal, foi isolada em tecidos de ovinos, bovinos, ratos, visão e humanos e é própria de cada espécie. Apesar desta especificidade, observa-se uma homologia de 80-90% entre as isoformas fisiológicas interespecíficas. Diferentes autores sugerem que quanto mais próxima é a estrutura das proteínas fisiológicas entre espécies diferentes, maior é o risco de uma isoforma patológica para uma espécie também o ser para outra (Hope et al., 1999). Esta hipótese é confirmada pela observação de que a proteína priónica associada à BSE só difere em 7 aminoácidos da proteína correspondente nos ovinos, o que teria permitido ao agente do *scrapie* ultrapassar a barreira de espécie, causando a BSE nos bovinos (Hope et al., 1999). Ainda assim, este facto ainda não está provado, até porque existem algumas evidências experimentais de que poderá ter sido uma das formas atípicas de BSE, recentemente identificadas a ter-se alterado para a forma clássica (Hope et al., 1999). A forma patológica PrP^{sc} induz a alteração da forma fisiológica PrP^c que adquire uma conformação anormal. As características destas duas isoformas estão indicadas na Tabela 3.

As proteínas priónicas são então caracterizadas pela capacidade de apresentarem duas formas tridimensionais, uma das quais causando doença quando agregada. A hipótese de Prusiner de 1997 afirma que esta agregação causa danos neurológicos específicos como os característicos das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Os mecanismos responsáveis pela alteração de conformação e agregação permanecem por esclarecer cabalmente.

Tabela 3 - Isoformas fisiológica PrP^c e patológica PrP^{sc}

	PrP^c	PrP^{sc}
Designação	isoforma fisiológica isoforma normal	isoforma patológica isoforma anormal
Localização	membrana celular	citoplasma em lipossomas e extracelular
Peso molecular	33-35 KDa	27-30 KDa
Tamanho da cadeia	256 aa	256 aa
Estrutura primária	idêntica	idêntica
Estrutura secundária	42% hélices alfa 3% folhas beta	43% folhas beta 30% hélices alfa
Solubilidade	solúvel em detergentes	insolúvel em detergentes, polimerizando-se em fibrilhas
Digestão por proteinase K	sensível	resistente

1.3.2. Visualização da proteína priónica

A prática científica está muito dependente da visualização direta que suporta os conceitos propostos. Assim, embora Prusiner (1982) tenha usado a Bioquímica para desenvolver a sua tese, são as representações tridimensionais em computador das estruturas terciárias das proteínas normal e patológica a base para este modelo (já não uma mera hipótese, uma vez que tem confirmação experimental e capacidade para aplicação noutras áreas de estudo).

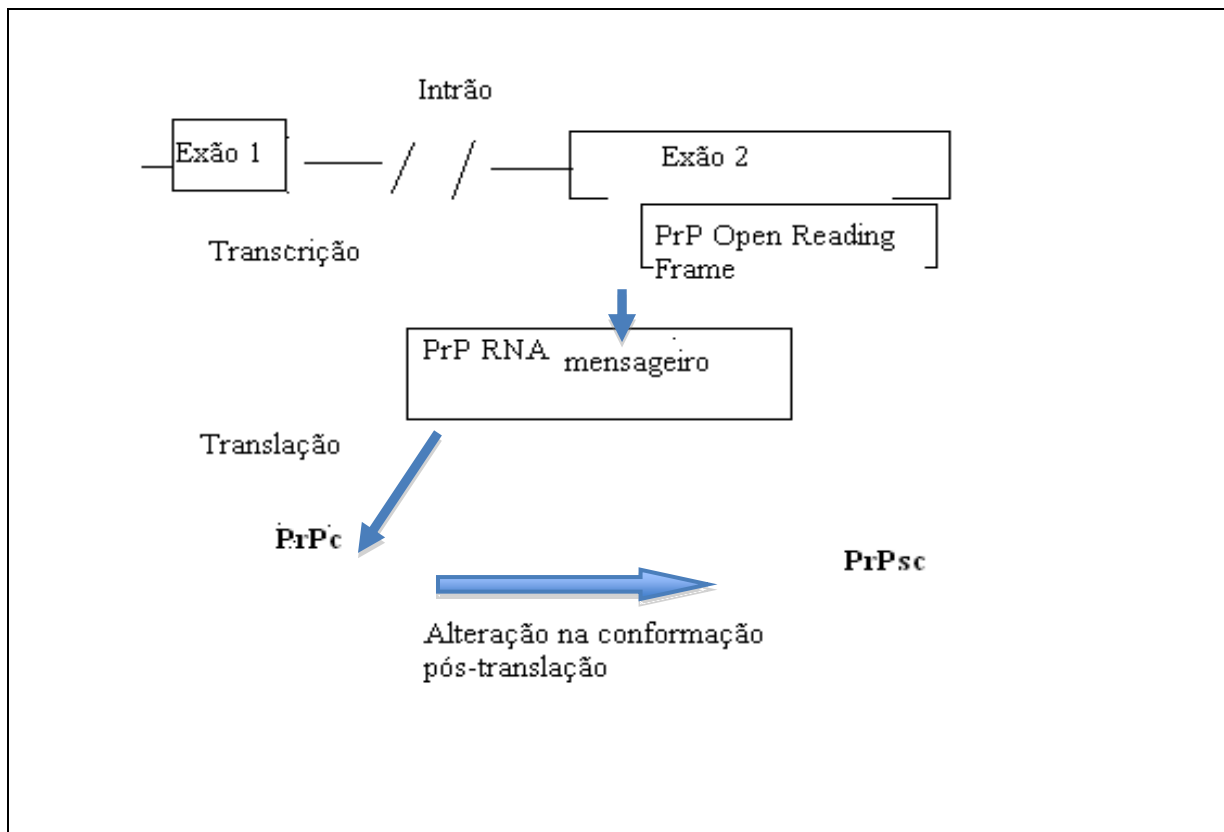
Como sabemos, a estrutura primária das proteínas é dada pela sequência dos aminoácidos, o seu arranjo em hélices-alfa ou folhas-beta define a estrutura secundária. Estas duas estruturas podem ser facilmente definidas sem recurso a uma representação gráfica.

A estrutura terciária e sua cinética, porém, já só podem ser descritas na sua complexidade com recurso a ferramentas de visualização gráfica (a estrutura secundária só indicia o arranjo da terciária). O processo de *protein folding* corresponde à aquisição da estrutura terciária.

A estrutura secundária da PrP foi proposta por Prusiner em 1992. Prusiner e a sua equipa usaram péptidos de síntese compostos por hélices-alfa. A maioria destes péptidos (75%) formou placa amilóide, típica da doença de Alzheimer, e composta maioritariamente por folhas-beta. Daqui, chegaram à ideia de que uma alteração putativa na conformação entre a PrP^c e a PrP^{sc} seria devida à transformação na estrutura secundária de hélices-alfa para folhas-beta.

Na figura 1 podemos observar o esquema de formação da PrP^{sc} segundo Prusiner.

Figura 1 - Formação da PrP^{sc} segundo Prusiner (1992)



A estrutura tridimensional da PrP^c tem sido utilizada para descrever a alteração conformacional nos seus aspetos dinâmicos. A flexibilidade de uma proteína é de difícil descrição. Nos últimos 50 anos, os investigadores preocuparam-se mais em descrever as estruturas dos polipéptidos, tendo negligenciado as suas propriedades dinâmicas. Assim, a PrP^c tem vindo a ser representada em diagramas que mostram as partes mais rígidas do polipéptido bem como as mais adaptáveis ou flexíveis (Donne et al., 1997). Estes diagramas caracterizam a PrP^c, sendo resultado da pesquisa e, condicionam também a forma como os investigadores definem o seu objeto.

1.3.3.A infecção pela PrP^{sc}: mecanismos moleculares

À medida que foi sendo esclarecido que a informação genética não era relevante para a compreensão das doenças priónicas, outras hipóteses foram surgindo para explicar a propagação da PrP^{sc}. Em 1996, Aguzzi e Weissman mostraram que a PrP^c era necessária para a infecção pela PrP^{sc}. Desistiram, então, da hipótese da informação (genética) e criaram uma nova – a do efeito de dominó.

Estas novas descobertas (o facto de que a PrP^c é necessária para a infecção por scrapie) podem ser explicadas pela hipótese do “efeito dominó” em que a disseminação dos príões do scrapie no Sistema Nervoso Central (SNC) ocorre *per continuitatem* e por conversão de PrP^c em PrP^{sc} por influência de PrP^{sc} adjacente (Brandner et al., 1996).

Esta mudança de paradigma foi tão importante que foi elaborado um modelo a partir dela. Em 2000, um novo estudo ilustra a neuroinvasão no Sistema Nervoso Periférico (SNP) sugerindo uma forma de transporte em que a PrP^c localizada no SNP é convertida em PrP^{sc} *per continuitatem* e de forma centrípeta até ao SNC (Glatzel, Giger, Braun & Aguzzi, 2000).

Outra metáfora é a da “maçã podre” tentando ilustrar como uma propriedade se pode transmitir sem fluxo de informação. Como uma maçã podre, uma vez no cérebro, a forma mutante da proteína priónica transforma a proteína normal em mais cópias da forma infecciosa (Glatzel et al., 2000).

Como temos visto até aqui, e de acordo com o atualmente aceite, a PrP^{sc} é uma isoforma particular da proteína celular PrP^c, com fraca solubilidade em detergentes, alta resistência à digestão por proteases, e tendência a formar agregados (a PrP^{sc} é composta maioritariamente por folhas-beta que criam dipolos eléctricos com propensão para formar agregados amilóides). A diferença funcional entre as duas isoformas é explicada pelas diferenças na sua estrutura secundária¹. Após a entrada da forma infecciosa da PrP num organismo, ou da sua ocorrência espontânea, a PrP^c é convertida em PrP^{sc} pela proteína infecciosa. Nas formas hereditárias das doenças priónicas, e no nosso caso da doença em análise, no *scrapie* clássico, há uma maior disposição das proteínas para a conversão na forma patogénica.

Há dois modelos propostos para explicar o rearranjo da PrP^c em PrP^{sc}. O primeiro modelo proposto é o do “heterodímero”, a transição da molécula de PrP^c para PrP^{sc} é induzida pela ligação ao monómero da PrP^{sc} (Cohen, 1994) formando um dímero. Após a aquisição de propriedades priónicas pela PrP^c, o dímero sofre dissociação em dois monómeros PrP^{sc} livres para participarem noutros rearranjos conformacionais. Este processo sugere uma reacção em cadeia e garante a conversão da maioria das moléculas de PrP^c na forma patogénica.

A formação de agregados de PrP^{sc}, neste modelo, é considerada um processo secundário não relacionado com a alteração conformacional. O segundo modelo, o da “polimerização”, sugere que a alteração conformacional PrP^c→PrP^{sc} e a formação de agregados estão relacionadas: a PrP^c é convertida em PrP^{sc} enquanto se liga ao oligómero de PrP^{sc} (Keh-Ming et al., 1993). Este modelo foi confirmado por estudos *in vitro* que demonstram que só

¹ Vide tabela 3, pp.7 deste trabalho para pormenores acerca das diferentes estruturas secundárias das duas isoformas da proteína priónica.

agregados de grande peso molecular, e não monómeros, possuem a capacidade de formar novas formas infecciosas da proteína.

O gene que codifica para a PrP^c encontra-se presente em diferentes mamíferos e em galinhas, tendo sido preservado pela pressão de seleção evolutiva. A sua presença e expressão em animais doentes e saudáveis não estão dependentes da ocorrência de infecção priónica (PrP^{sc}). Porém, animais a quem se suprimiu o gene para a PrP^c apresentaram maior resistência à infecção e animais a quem se favoreceu a expressão deste gene desenvolveram doença mais rapidamente. Este facto veio apoiar a tese priónica e a natureza proteica dos priões. Uma característica importante dos priões como agentes infecciosos é a existência de barreiras para a sua transferência interespecífica, apesar da muita semelhança entre a estrutura primária da PrP^c dos diferentes mamíferos (Prusiner, 1997). Todavia, estas barreiras não impedem a infecção, simplesmente tornam-na mais lenta entre espécies diferentes. As barreiras estão relacionadas com as diferentes estruturas primárias das PrP^c dos diferentes mamíferos: as PrP^{sc} de hamster não são transferidas com eficiência para ratos, mas são-no com eficiência para ratos transgênicos que expressam PrP^c de hamster (Tanaka, Chien, Yonekura & Weissman, 2005).

Presentemente, não há terapêutica para as doenças priónicas. Algumas das hipóteses mais promissoras relacionam-se com a diminuição do nível de expressão do gene para a PrP^c (mas a que custos?), a prevenção da conversão da PrP^c em PrP^{sc}, e a ativação de factores de destruição dos agregados de PrP^{sc}. Os estudos usando animais de laboratório e eucariotas mais simples como as leveduras terão um papel importante no desenvolvimento de abordagens terapêuticas para as doenças priónicas.

Os investigadores assumem que a compreensão da alteração conformacional em leveduras vai contribuir para o estudo das PrP dos mamíferos. As leveduras reproduzem-se em poucas horas e são de mais fácil manuseio. A levedura mais usada na sustentação do modelo priónico é a *Saccharomyces cerevisiae* (Tabelas 4 e 5) (Fernandez-Bellot & Cullin, 2001).

Tabela 4 – Designação das proteínas priónicas de mamíferos de acordo com a forma de doença

Doença	Hospedeiro	Prião	Isoforma PrP
Scrapie, Tremor Epizoótico	Ovinos (<i>Ovis aries</i>) e Caprinos (<i>Capra hircus</i>)	Prião scrapie	OvPrP ^{sc}
Encefalopatia transmissível do vison (TME)	Visão	Prião TME	MkPrP ^{sc}
Doença Emaciante Crónica (CWD)	Veado-mula, alce	Prião CWD	MDePrP ^{sc}
Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE)	Bovinos (<i>Bos taurus</i>)	Prião BSE	BovPrP ^{sc}
Encefalopatia Espongiforme Felina (FSE)	Gatos (<i>Felis silvestris catus</i>)	Prião FSE	FePrP ^{sc}
Encefalopatia dos Exóticos Ungulados (EUE)	Nyala e grande Kudu	Prião EUE	NyaPrP ^{sc}
Kuru	Homem	Prião Kuru	HuPrP ^{sc}
Doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD)	Homem	Prião CJD	HuPrP ^{sc}
Variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob (vCJD, nvCJD)	Homem	Prião BSE	BovPrP ^{sc}
Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Homem	Prião GSS	HuPrP ^{sc}
Insónia Familiar Fatal (FFI)	Homem	Prião FFI	HuPrP ^{sc}

Tabela 5 - Priões Fúngicos

Proteína	Hospedeiro	Nome do Prião
Ure2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prião URE 2+
Sup35p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prião PSI+
Rnq1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prião PIN+ ou RNQ+
HET-S	<i>Podospora Anserina</i>	Prião Het-s

Os diferentes modelos de replicação da proteína priónica descrevem a conversão da PrP^c em PrP^{sc} como um evento de natureza autocatalítica que não requer quaisquer fatores adicionais para a sua ocorrência. Este facto foi confirmado por experiências *in vitro*. Porém, o aparecimento e manutenção da PrP^{sc} *in vivo* podem depender da interação com outras proteínas. Alguns autores defendem a existência de uma proteína de mamífero não identificada ainda, capaz de interagir com a PrP^c estimulando a sua conversão na forma patogénica. Os estudos em leveduras revelam a existência de *chaperones* necessárias à manutenção da conformação patogénica da proteína. Demonstrou-se que a manutenção do prião PSI+ depende da actividade de uma proteína *chaperone* Hsp104p: a ausência ou a expressão aumentada desta elimina PSI+ (Bardill, Dulle & Fisher, 2009).

1.3.4. Função biológica da PrP^c

Apesar de muito se saber sobre a função da proteína priónica como agente de várias doenças, a sua função fisiológica permanece por esclarecer inteiramente. Os fragmentos da sequência da PrP^c têm sido bastante conservados evolutivamente (Rivera-Milla, Oidtmann & Panagiotidis, 2006), sugerindo importantes papéis biológicos para a proteína. A PrP^c é expressa cedo na embriogénese, e no adulto está presente em maior quantidade nos neurónios do cérebro e medula espinhal (Manson et al., 1992). A PrP^c também é encontrada em menor número nas células da glia do SNC e também em células periféricas. (Moser, Colello, Pott & Oesh, 1995). A PrP^c exerce uma atividade citoprotetora, particularmente contra a apoptose celular. Esta atividade foi demonstrada em células de mamíferos e de leveduras. A PrP^c também é uma proteína de ligação ao cobre (Brown et al., 1997). A maioria da PrP^c está localizada na superfície celular e daí que se preveja que participe na sinalização transmembranar. A PrP^c também está envolvida na regulação sinática. Esta hipótese é consistente com o facto de que a patologia sinática ser uma ocorrência frequente nas doenças priónicas. A PrP^c interage com proteínas envolvidas na adesão celular.

As proteínas priónicas fúngicas parecem ser um modelo adequado para o estudo do fenómeno priónico. As suas principais vantagens sobre as PrP de mamíferos são a sua disponibilidade e a possibilidade de multiplicação rápida e segura em contexto laboratorial.

Os priões e as placas amilóides estão associados a doenças de mamíferos. Porém, em leveduras e no fungo *Podospora*, a conversão da proteína celular em proteína patogénica tem um valor adaptativo. Esta conversão parece ocorrer com maior frequência do que as mutações. A reversão PrP^{sc}→PrP^c parece ocorrer também com maior frequência do que a reversão de mutações: ao contrário do que acontece nas mutações, o fenótipo das proteínas priónicas patogénicas mantém a informação original da proteína celular.

Isto tem grande importância adaptativa, uma vez que falamos de organismos unicelulares para quem a resposta a mudanças ambientais através da alteração fenotípica é essencial. A informação sobre o fenótipo ótimo padrão é preservada e há possibilidade de regresso a este (Reed, Waples, Schindler, Hard & Kinnison, 2010).

1.4. Formas de *scrapie*

Os estudos de demonstração experimental têm evidenciado a variabilidade biológica dos isolados de *scrapie*, caracterizados depois de subpassagens em ratinhos através de distintos períodos de incubação e de diferente distribuição das lesões cerebrais, definindo diferentes estirpes (Yokoyama et al., 2010). Em 1998, um tipo diferente de *scrapie* foi identificado num ovino na Noruega e daí a designação de *scrapie atípico/Nor98* (Benestad, Arsac, Goldmann, Noremark, 2008). Desde a implementação, na Europa em 2002, de um programa abrangente de vigilância para as TSEs em pequenos ruminantes, que tem surgido um número crescente de *scrapie* atípico/Nor98 na maioria dos países europeus, um caso nas ilhas Falkland e nos Estados Unidos da América. Verificou-se um caso no Reino Unido num estudo retrospectivo que continha material a partir de 1987 (Webb et al., 2009).

As estirpes de TSE são definidas como partículas infecciosas que exibem características biológicas e bioquímicas distintas *et por cause*, após inoculação, causam doenças priónicas com características bem definidas como o espetro de hospedeiros, períodos de incubação, alterações neuropatológicas, patogénese das doenças e sinais clínicos, bem como as características biológicas da correspondente PrP^{sc}. A informação necessária para determinar a estirpe da TSE é dependente da conformação da proteína patológica PrP^{sc}.

Diferentes tipos de TSEs afetam os ovinos e os caprinos. Para além da forma clássica de *scrapie*, ambas as espécies são susceptíveis a infeções experimentais pelo agente da encefalopatia espongiforme bovina (BSE).

Em 2005, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) publicou uma classificação das TSEs em pequenos ruminantes, dividindo-os em três categorias de diagnóstico: *scrapie* clássico, BSE em pequenos ruminantes, e *scrapie* atípico / Nor98 (Tabela 6).

Tabela 6 - Categorização das TSEs em pequenos ruminantes (adaptação da EFSA (2005))

Tipo de TSE	Western Immunoblotting		Histopatologia e Imunohistoquímica	Notas
	Condições severas de digestão pela Proteinase K	Condições moderadas de digestão pela Proteinase K		
<i>Scrapie</i> Clássico	Três bandas acima dos 15 kDa	Três bandas acima dos 15 kDa	Vacuolização da substância cinzenta. Marcação específica da medula oblonga envolvendo o núcleo motor dorsal do nervo vago (DMNV)	Afeta genótipos suscetíveis dos 2 aos 5 anos de idade.
BSE em Pequenos Ruminantes	Três bandas. Dominância da banda di-glicosilada. Fraca ou ausente marcação com anticorpos anti-PrP dirigidos para a parte N-terminal da PrP. Banda não glicosilada mais baixa do que no <i>scrapie</i> clássico.		Vacuolização da substância cinzenta. Marcação específica da medula oblonga envolvendo o DMNV	
Atípica/ Nor 98	Negativo ou mostrando um perfil distinto de outras TSE.	Bandas múltiplas com a banda abaixo dos 15 kDa.	Não há envolvimento do DMNV. Marcação específica no nervo trigémio. Marcação específica mais intensa nos córtices cerebelar e cerebral.	Afeta ovinos a partir dos 4 anos. Maior suscetibilidade de dos alelos AHQ, AF141RQ, e ARR. Mais frequente em casos isolados no rebanho.

Relativamente às características do *scrapie* atípico em caprinos ainda não estão descritas com precisão, estando reportados apenas alguns casos (Seuberlich et al., 2007; Sofianidis et al., 2008). Apesar de não haver diferenças na estrutura molecular da PrP^{sc} isolada desta espécie animal quando comparada com ovinos com *scrapie* atípico, notaram-se diferenças na distribuição das lesões histopatológicas e na deposição da PrP^{sc}- particularmente no córtex cerebelar, um local privilegiado de deposição da PrP^{sc} no *scrapie* atípico em ovinos, encontrava-se praticamente intacto no caso descrito por Seuberlich e colaboradores (2007). Neste animal foram detetadas lesões graves e deposição de PrP^{sc} em estruturas cerebrais mais rostrais como o tálamo e mesencéfalo. Os testes de triagem e imunohistoquímica para as TSEs utilizando o cerebelo e o obex, as regiões de eleição para o diagnóstico de TSEs em ovinos e caprinos, apresentaram-se negativos ou fracamente positivos. Isto sugere que tais casos poderão ter escapado à vigilância no passado e poderão voltar a sê-lo no futuro se os procedimentos e testes não forem modificados em conformidade com os novos dados.

1.4.1. Sinais clínicos do *scrapie* atípico/Nor98 em ovinos

A grande maioria dos ovinos com *scrapie* atípico/Nor98 foi diagnosticada através de programas de vigilância ativa em ovinos aparentemente saudáveis ou ovinos mortos sem causa aparente. Daqui podemos sugerir que os sinais clínicos, quando presentes, podem ser diferentes ou menos pronunciados do que aqueles verificados no *scrapie* clássico. Estes factos também podem decorrer da epidemiologia da doença, sendo que por apenas um animal que mostra sinais da doença o produtor vai evitar chamar o veterinário responsável.

Na tabela 7, indica-se a forma de morte de ovinos consoante o tipo de *scrapie*, verificando, por exemplo, que a maioria dos ovinos afetados pela forma clássica é abatida seletivamente, denunciando a presença de sinais clínicos, enquanto, que os animais afetados pela forma atípica são a maioria das vezes encontrados mortos sem causa aparente.

**Tabela 7 - Forma de morte de ovinos consoante o tipo de *scrapie* na Alemanha
(Lühken et al., 2007)**

Forma de morte	Ovinos positivos para o <i>scrapie</i> clássico		Ovinos positivos para o <i>scrapie</i> atípico	
	n	%	n	%
Abate para consumo	0	0	23	27.3
Encontrados mortos	23	22.0	55	65.5
Eutanasiados	2	1.9	4	4.8
Abate Compulsivo	80	76.1	2	2.4
Total	105	100.0	84	100.0

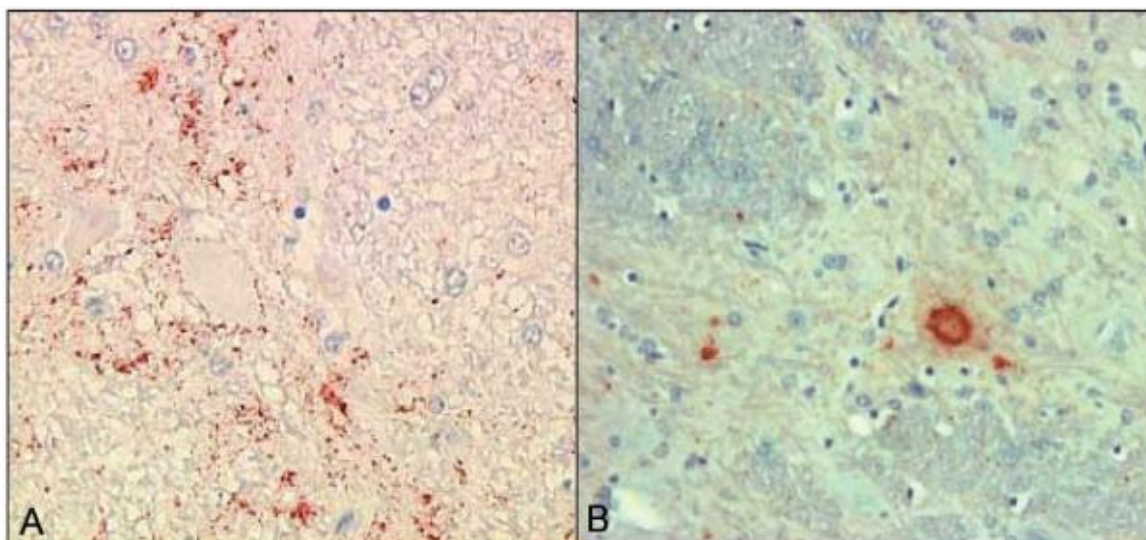
O sinal clínico mais evidente nos animais afetados pela Nor98 é a ataxia (Konold et al., 2007). Para além deste, surge a ansiedade e perda de condição corporal. A ataxia dos membros posteriores também foi relatada em dois casos suecos, sendo que um deles apresentava rigidez e fraca condição corporal, enquanto outros casos suecos não mostraram quaisquer sinais clínicos como referido pelo produtor. Na Irlanda, dois casos suspeitos apresentavam os mesmos sinais clínicos: incoordenação motora, perda de peso e comportamento nervoso (Konold et al., 2007). O caso nas ilhas Falkland mostrava fraca condição corporal e comportamento fora do normal, mordendo com persistência o membro posterior e tendo caído quando tentava correr (Konold et al., 2007). Os dois casos detetados no Reino Unido mostraram também ataxia e atraso no reposicionamento dos membros pélvicos. Ambos evidenciavam sinais de doença cerebelar, mas os sinais não eram idênticos (hipermetria no primeiro caso, ataxia, cabeça trémula, e resposta anormal à ameaça no segundo caso). Adicionalmente, o primeiro caso exibia nervosismo, enquanto o segundo mostrava apatia, especulando-se que estas diferenças talvez se devessem a diferentes cursos clínicos, facto sustentado pelo maior nível de PrP^{sc} evidenciado por *Western Immunoblotting* no cérebro do segundo caso (Konold et al., 2007). Não foi detetado prurido em nenhum dos casos, mas um dos casos clínicos do Reino Unido mostrou resposta positiva ao “teste do arranhão” (*scratch response*).

1.4.2. Distribuição da PrP^{sc} no *scrapie* atípico/Nor98

Em casos de *scrapie* atípico/Nor98, a deposição de PrP^{sc} por exame imunohistoquímico surge como um pontilhado fino ou sob a forma de depósitos granulares tanto na substância branca como na substância cinzenta. Ainda não foram relatados depósitos intraneuronais ao contrário da maioria dos casos de *scrapie* clássico (Benestad et al., 2008).

No tronco cerebral têm sido descritos casos totalmente negativos ao nível do óbex, enquanto outros casos têm revelado marcação mínima somente no trato espinal do núcleo do nervo trigémio e no núcleo do trato solitário (Orge et al., 2004). A estrutura primariamente afetada no *scrapie* clássico, o núcleo motor dorsal do nervo vago (DMNV) nunca surge afetado no *scrapie* atípico/Nor98. Para além da marcação do trato espinal do núcleo do nervo trigémio, notou-se marcação globular pronunciada em tratos da substância branca, bem como na formação reticular e núcleo ambíguo. Em geral, a marcação específica para a PrP^{sc} na medula oblonga é menor no *scrapie* atípico/Nor98 do que em casos clássicos de *scrapie*. Ao contrário do que acontece no *scrapie* clássico, os córtices cerebrais e cerebelares são os que evidenciam maior marcação específica nos cérebros dos ovinos afetados pela *scrapie* atípico/Nor98. Alguns casos de *scrapie* atípico/Nor98 revelaram marcação linear e perineuronal típica do *scrapie* clássico na *substantia nigra* (Benestad et al., 2008). Também importante é a presença de agregados multifocais e tipo placa encontrados no *tectum* e corpo geniculado lateral do mesencéfalo, e em tratos da substância branca do córtex cerebral (Figura 2). A PrP^{sc} não é detetada em tecidos periféricos de casos de *scrapie* atípico/Nor98 ao contrário do que acontece no *scrapie* clássico (Benestad et al., 2008).

Figura 2 - Imunohistoquímica para a PrP^{sc} usando mAb anticorpo F89/160.1.5 em dois casos de *scrapie* atípico/Nor98na Noruega (Benestad et al., 2008)



A- Depósitos perineuronais no neurópilo de PrP^{sc} na *substantia nigra*; notar a ausência de marcação intraneuronal. B – Agregados tipo placa no córtex cerebral.

1.4.3. Epidemiologia do *scrapie* atípico/Nor98

O *scrapie* atípico/Nor98 foi detetado pela primeira vez na Noruega em 1998 e foi considerado um problema exclusivamente norueguês. Devido à suspeita de BSE em ovinos e caprinos implantou-se um plano de vigilância intensivo e ativo para as TSEs em pequenos ruminantes pelo uso de testes rápidos em 2002. Este plano de vigilância ativa permitiu a detecção da *scrapie* atípico/Nor98 na maioria dos países europeus bem como nas ilhas Falkland e na América do Norte. O *scrapie* atípico/Nor98 representa uma parte significativa de casos de TSEs identificados na União Europeia e a sua prevalência varia entre 5 a 8 pequenos ruminantes por 10 000 testados por ano (Fediaevsky, Gasqui, Calavas & Ducrot, 2008).

A epidemiologia do *scrapie* atípico/Nor98 não está ainda completamente esclarecida e ainda não é certo se é naturalmente transmissível ou não. Enquanto a maioria dos casos tem sido detetada em ovinos, um número limitado de *scrapie* atípico em caprinos tem sido relatado em França, Itália e Suíça.

A maioria dos casos deste tipo de *scrapie* tem sido detetada, como já referido, através de programas de vigilância ativa tendo como amostras animais encontrados mortos e animais em matadouro. Os programas de vigilância ativa dentro da União Europeia abrangem animais acima dos 18 meses de idade (determinada pelo exame da dentição). Na maioria dos países os ovinos não são individualmente identificados, sendo que o ano de nascimento nem sempre está disponível para cada caso detetado. Para 84 casos em 9 países a idade média dos animais

foi de 6.5 anos (Mitchell et al., 2010). Numa base de dados germânica, incluindo 60 casos atípicos, quase 60% dos animais tinha mais de 5 anos, mais de 25% tinham mais de 10 anos, e foram detetados casos de 20 anos (Mitchell et al., 2010) (Tabela 8).

Tabela 8 - Idade de ovinos positivos para os diferentes tipos de *scrapie* na Alemanha (Lühken et al., 2007)

Idade (ano)	Animais positivos para o <i>scrapie</i> clássico		Animais positivos para o <i>scrapie</i> atípico	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<3	2	10.0	5	8.3
3-5	16	80.0	20	33.3
6-7	2	10.0	9	15.0
8-10	0	0	10	16.7
>10	0	0	16	26.7
Total	20	100.0	60	100.0

Inicialmente, pensou-se que o *scrapie* atípico/Nor98 seria uma estirpe diferente de *scrapie* clássico, mas foi posteriormente identificado como uma nova estirpe de TSEs que afeta pequenos ruminantes e claramente distinta do *scrapie* clássico e da BSE em ovinos. A vigilância intensiva para as TSEs na Europa revelou que a doença está bastante disseminada e normalmente ocorre com casos isolados dentro de um rebanho. Os dados epidemiológicos acumulados durante os últimos anos também conduzem a esta separação entre *scrapie* clássico e *scrapie* atípico/Nor98 (Lühken et al., 2007). Na tabela 9 pode confirmar-se que a ocorrência esporádica de casos isolados de *scrapie* atípico num rebanho é mais frequente, quando comparamos com a ocorrência da forma clássica.

Tabela 9 - Animais positivos para os diferentes tipos de *scrapie* em rebanhos na Alemanha (Lühken et al., 2007)

Animais positivos para o <i>scrapie</i> por rebanho	Rebanhos positivos para o <i>scrapie</i> clássico		Rebanhos positivos para o <i>scrapie</i> atípico	
	n	%	n	%
1	7	43.8	81	92.0
2	2	12.5	5	5.7
3	1	6.3	2	2.3
4	1	6.3	0	0
5	1	6.3	0	0
8	1	6.3	0	0
15	1	6.3	0	0
17	1	6.3	0	0
57	1	6.3	0	0
Total	16	100.0	88	100.0

Apesar desta estirpe estar agora mais bem caracterizada, a sua origem é ainda desconhecida e serão necessários mais estudos de transmissão e análise de dados epidemiológicos em situação de campo, para melhor se esclarecer a patogénese desta estirpe e compreender a totalidade da sua epidemiologia e os possíveis aspetos zoonóticos.

1.4.4. A genética da PrP^{sc} associada ao *scrapie* atípico/Nor98

A acumulação da forma patogénica (PrP^{sc}) é a chave para a compreensão das TSEs, e a sua presença é usada como método de diagnóstico. Há vários fenótipos reconhecidos destas doenças que se diferenciam pelo tempo de incubação, distribuição da PrP^{sc} e padrão de deposição desta. O hospedeiro também contribui para o fenótipo da doença com o gene *prnp* que codifica para a proteína PrP^c, sendo um sentenciador para a suscetibilidade ao *scrapie* e respetivo fenótipo.

Os ovinos homozigóticos e heterozigóticos para o alelo ARR são considerados resistentes ao *scrapie* clássico e à BSE. Esta resistência constituiu a base de uma política de seleção genética em larga escala em que se pretendeu o controlo das TSEs, aumentando a frequência do alelo ARR e colocando nos rebanhos afetados animais ARR.

No *scrapie* atípico/Nor98 a suscetibilidade genética é bastante diferente daquela observada nas TSEs clássicas, são os animais AHQ e AFRQ os mais suscetíveis. Os animais ARR heterozigóticos e homozigóticos também são afetados. Os ovinos com *scrapie* atípico/Nor98 têm muitas vezes um polimorfismo na posição 141 do gene para a PrP que codifica fenilalanina (F) em vez da Leucina (L), o que parece conferir suscetibilidade à infecção por *scrapie* atípico/Nor98 (Pongolini, 2009).

Na tabela 10, estão referidos os genótipos de 241 casos de *scrapie* atípico/Nor98 de 4 países (Arsac et al., 2007; Lükhen et al., 2007; Moum et al., 2005)

Tabela 10 - Genótipos da PrP^{sc} associada ao *scrapie* atípico/Nor98

Genótipo (136/141/154/171)	Observações (n=241)	Frequência (%)
ALRQ/ALHQ	34	14.1
ALHQ/ALRR	32	13.3
AFRQ/ALRR	31	12.9
ALHQ/ALHQ	29	12.0
AFRQ/AFRQ	23	9.5
AFRQ/ALRQ	23	9.5
AFRQ/ALHQ	21	8.7
ALRR/ALRR	21	8.7
ALRQ/ALRQ	8	3.3
ALRQ/ALRR	8	3.3
AFRQ/VLRQ	5	2.1
ALHQ/ALRH	3	1.3
ALHQ/VLRQ	1	0.4
ALRH/ALRR	1	0.4
ALRH/ALRH	1	0.4
AFRQ/ALRH	0	0
ALRQ/ALRH	0	0
ALRQ/VLRQ	0	0
ALRH/VLRQ	0	0
ALRR/VLRQ	0	0
VLRQ/VLRQ	0	0

Mais de uma década após a descoberta do *scrapie* atípico/Nor98 (Benestad et al., 2003), há ainda muitas questões por resolver acerca da genética da PrP e suscetibilidade à doença. Está provado porém que o *scrapie* atípico afeta animais com genótipos da PrP diferentes dos do *scrapie* clássico. Pode ocorrer que o *scrapie* atípico/Nor98 esteja a ocupar um nicho de ovinos geneticamente resistentes ao *scrapie* clássico. Poderá ser indicador de competição entre estirpes, e exclusão da dupla infecção. Estes factos ainda não são definitivos. Há ainda a possibilidade alternativa de que o *scrapie* atípico/Nor98 ocorra espontaneamente (esporádica, não contagiosa), porque em geral têm ocorrido mais casos isolados de *scrapie* atípico/Nor98 (Tranulis, Benestad, Baron & Kretzschmar, 2011). O *scrapie* atípico/Nor98 seria a primeira TSE com esta classificação: a CJD esporádica (sCJD) em humanos também não se lhe conhece a origem. Os casos de sCJD são não-relacionados, não-familiares, e não aparentam alguma associação genética entre si. Ocorrem em locais arbitrários e independentemente de outras TSEs (Mead et al., 2009).

Uma das primeiras descrições completas da genética da PrP para o *scrapie* atípico/Nor98 foi determinada por Moum et al. em 2005. Apresentou 4 codões (codões 136, 141, 154 e 171) em 38 casos de Nor98 reunidos entre 1998 e 2004, chegando a 4 conclusões maiores. Primeiramente, todos os animais eram homozigóticos para alanina no codão 136 (AA₁₃₆ para a PrP). O alelo VRQ que confere a maior suscetibilidade ao *scrapie* clássico na Noruega (Tranulis. et al., 2011) estava completamente ausente dos casos de Nor98, embora presente em indivíduos de rebanhos saudáveis. Em segundo caso, havia predominante representação de animais portadores do alelo AHQ em genótipos HH¹⁵⁴ homozigóticos e HR¹⁵⁴ heterozigóticos. A terceira conclusão diz-nos que o alelo AF₁₄₁RQ parece conferir maior suscetibilidade do que o alelo AL¹⁴¹RQ. De facto, o alelo AF₁₄₁RQ confere maior risco do que o alelo AHQ. A elevada frequência do alelo ARR em animais heterozigóticos afetados também surpreendeu. Este alelo é bastante raro em casos de *scrapie* clássico. A idade média do início da doença foram os 6 anos, mas não foi encontrada nenhuma associação entre idade e genótipo. Poderá ser, então, que esta idade média, superior àquela do *scrapie* clássico se deva a genótipos distintos.

Outros estudos sobre o *scrapie* atípico/Nor98 da Alemanha (Lühken et al., 2006), França (Arsac et al., 2007), e do Reino Unido (Bruce et al., 2007; Saunders, Cawthraw, Mountjoy, Hope & Windl, 2006) chegaram à mesma conclusão de que este tipo de *scrapie* está fortemente associado com os codões 141 e 154 para a PrP (Tabela 10). A suscetibilidade dos homozigóticos RR₁₇₁ levanta enorme preocupação pelos planos de erradicação e criação em membros da EU que criaram uma elevada frequência de animais ARR/ARR como forma de erradicar o *scrapie* clássico.

Tal como nos ovinos, os caprinos com os genótipos que codifiquem para a PrP HH¹⁵⁴ e HR¹⁵⁴ parecem ser alvo do *scrapie* atípico/Nor98, embora ainda seja cedo para estabelecer esta associação estatística.

Ainda faltam experiências em ovinos e ratinhos transgênicos para averiguar os genótipos suscetíveis. Talvez então se possa explicar porque o genótipo VRQ/AHQ apresenta fraco risco para ambos os tipos de *scrapie*, apesar de conter dois alelos com maior suscetibilidade para os *scrapies* clássico e atípico/Nor98, respetivamente (Moum et al, 2005).

Até ao momento, a maioria dos casos ocorre então em ovinos mais velhos e em genótipos para a PrP associados à relativa resistência ao *scrapie* clássico, nomeadamente, aqueles que contêm ARR e AHQ ou AF¹⁴¹RQ.

1.4.5. Transmissão e Patogenia de *scrapie* atípico/Nor98

Desde a descoberta do *scrapie* atípico e sua subsequente identificação, sobretudo através de vigilância ativa, em diversos países (alguns sem nenhuma história de encefalopatias espongiiformes transmissíveis como a Nova Zelândia e a Austrália), tem-se discutido se esta TSE é de facto espontânea ou adquirida. Os estudos epidemiológicos indicam que o *scrapie* atípico/Nor98 não aparenta ser transmitido entre animais em condições naturais (Andréoletti, Orge, Benestad, Beringue & Litaise, 2011). Nas TSEs, é maioritariamente aceite que a ingestão de material infetado, (transmissão por via oral) seja o componente chave de transmissão em algumas TSEs, como a Kuru, a variante da doença de Creutzfeldt-Jacob, a encefalopatia espongiiforme bovina, e a encefalopatia transmissível do visão (Chesebro, 2003).

A população ovina tem demonstrado suscetibilidade a estirpes particulares de TSEs que varia de acordo com os polimorfismos do gene que codifica a proteína priónica dos ovinos. A transmissão experimental de *scrapie* atípico a ovinos após inoculação intracerebral tem estado relacionada a um genótipo particular (A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁, A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁) (Simmons et al., 2010).

A distribuição tecidual da proteína patológica (PrP^{Sc}) em ovinos infetados pela encefalopatia espongiiforme bovina fez levar a cabo medidas de saúde pública de monta, baseada no conhecimento da patogénese e distribuição da PrP^{Sc} em tecidos edíveis, e sua conseqüente remoção de carcaças de animais acima de uma certa idade. O *scrapie* clássico pode também mostrar distribuição ubíqua da PrP^{Sc} nos tecidos periféricos. Os dados mais recentes relativos ao *scrapie* atípico indicam que os tecidos periféricos de animais naturalmente infetados com esta forma de *scrapie* podem hospedar capacidade infecciosa mesmo na ausência de PrP^{Sc} detetável (Andréoletti et al., 2011). Porém, não é certo se esta capacidade infecciosa se estabelece antes ou depois da propagação do agente no sistema nervoso central.

A informação acerca da distribuição tecidual do *scrapie* atípico/Nor98 no hospedeiro é ainda limitada. Contudo, os dados indicam que a PrP^{sc} patológica não tem sido detetada em tecidos periféricos, embora haja infecciosidade, sugerindo que este agente infeccioso parece restrito ao SNC, evidenciando notável neurotropismo. Esta característica indica que o risco de infeção por *scrapie* atípico/Nor98 pela dieta possa ser considerado baixo. Este neurotropismo sustenta a hipótese de que o agente do *scrapie* atípico/Nor98 dificilmente se transmite para o ambiente e entre indivíduos. A deteção da PrP^{sc} está normalmente correlacionada com a presença de infetividade (McKinley, Bolton, Prusiner, 1983, Elsen et al. 1999), mas a capacidade infecciosa já foi demonstrada na ausência de detetável PrP resistente à proteinase K (Lasmezas et al., 1997). Todavia, a PrP^{sc} é atualmente considerada como o único marcador bioquímico das TSEs.

Já foram identificadas várias estirpes de *scrapie* tendo em conta a distribuição pelos tecidos do hospedeiro, diferentes períodos de incubação, perfis lesionais, neuropatologia e resistência à protease. Ao contrário do que acontece no *scrapie* clássico, em que várias estirpes já foram identificadas, no *scrapie* atípico/Nor98 nenhuma subestirpe foi identificada até à data. O *scrapie* atípico/Nor98 surge como doença não contagiosa, esporádica e neurodegenerativa dos ovinos mais velhos. Numerosos estudos epidemiológicos sugerem uma etiologia espontânea, possivelmente geneticamente determinada, influenciada pelo ambiente, e/ou fatores metabólicos. Na maioria dos casos há apenas um caso de *scrapie* atípico/Nor98 num rebanho, o que conduziu à suspeita da sua condição não naturalmente infecciosa. A transmissão oral a murganhos e roedores da espécie *Myodes glareolus* também falhou (Griffiths et al., 2010). Todavia, o *scrapie* atípico/Nor98 foi transmitido por via intracerebral a ratinhos transgênicos expressando o gene priónico de ovinos (Arsac, Bétemps, Morignat, Féraudet & Bencsik, 2009) e de suínos (Espinosa et al., 2009). A transmissão intracerebral de *scrapie* atípico também foi bem sucedida em ovinos (Simmons et al., 2007). Nesta espécie esta forma de *scrapie* foi transmitida por via oral (Simmons et al., 2010), o que demonstra que se trata mesmo de uma TSE.

1.4.6. Ocorrência de *scrapie* atípico/Nor98 antes de 1998

A confirmação do diagnóstico das TSEs baseia-se na deteção de PrP^{sc} pelas técnicas de imunohistoquímica (IHC) e *Western Immunoblotting*. Nos casos de *scrapie* clássico os depósitos de PrP^{sc} distribuem-se de forma mais disseminada e com diferente morfologia. Observam-se também depósitos de PrP^{sc} no núcleo motor dorsal do nervo vago. O tipo de deposição de PrP^{sc} no *scrapie* atípico é bastante diferente, com somente 3 formas (granular, linear e perineuronal). O *scrapie* clássico e atípico também diferem na sua disposição

neuroanatômica, sendo que a região rostral do cérebro é mais afetada pelo *scrapie* atípico e a caudal mais afetada pelo *scrapie* clássico. A PrP^{sc} no *scrapie* atípico também origina diferentes perfis usando a técnica de *Western Immunoblotting*, com a presença de uma banda proteica de aproximadamente 12 kDa (Benestad et al., 2003; Buschmann, Biacabe, Ziegler, Benesik, 2004).

Estas metodologias foram as utilizadas nos dois estudos retrospectivos reportados, ambos efectuados no Reino Unido. O primeiro identificou um ovino com *scrapie* atípico/Nor98 do ano de 1989 (Bruce et al., 2007), e o segundo estudo um caso datado de 1987 (Webb et al., 2009). Neste segundo estudo (Tabela 11) o caso de *scrapie* atípico identificado correspondia a um ovino suspeito de *scrapie* ou listeriose que apresentava “comportamento bizarro”. À altura não se observou vacuolização ao exame histopatológico e daí se excluiu o diagnóstico de *scrapie*. Mais tarde a imunopatologia revelaria um diagnóstico consistente com o *scrapie* atípico, sendo o genótipo AHQ/AHQ, um dos genótipos mais associados ao *scrapie* atípico e com alguma resistência ao *scrapie* clássico (Simmons et al., 2010).

Tabela 11 - Número de animais testados por imunohistoquímica (IHC) entre 1980 e 1989 no Reino Unido (Webb et al., 2009)

Ano	Nº de animais negativos para o <i>scrapie</i>	Nº de animais positivos para o <i>scrapie</i>	Nº de amostras impróprias para diagnóstico
1980	3	14	0
1981	1	0	0
1982	10	5	2
1983	69 (3)	10	3
1984	139	19	4
1985	132	15	2
1986	145 (7)	24	12
1987	197 (12)	34	17
1988	223 (19)	23	4
1989	236 (7)	29	13
Total	1155	173	57

O nº de caprinos encontra-se entre parêntesis

A análise estatística de animais encontrados mortos e em matadouro indicam que o *scrapie* atípico poderá ser uma doença espontânea com pouca ou nenhuma transmissibilidade entre ovinos. De facto, casos adicionais de *scrapie* atípico em rebanhos é rara, embora a transmissão experimental da doença tenha sido provada (Le Dur et al., 2005, Simmons et al., 2007). O *scrapie* atípico já não é considerado raro relativamente ao *scrapie* clássico na maioria dos países europeus (Moore, 2008).

Apesar de não se saber o potencial zoonótico do *scrapie* atípico, a ausência de doença humana com características semelhantes ao *scrapie* atípico pode ser interpretada com maior otimismo se houver prova de que a exposição a este tipo de *scrapie* não é um fenómeno recente.

1.4.7.A situação de Portugal

Portugal foi um dos primeiros países europeus a descrever a existência de *scrapie* atípico. Num estudo em que mais de 30 000 pequenos ruminantes foram testados para as TSEs, identificaram-se sete casos de *scrapie* atípico. Não foi identificado nenhum caso de *scrapie* clássico, assim como sucedeu em estudos anteriores. Este facto surpreendeu dado que em vários países europeus o *scrapie* clássico é enzoótico, inclusivé em Espanha (Orge et al., 2004).

Entre os anos de 2003 e 2008, 375 459 pequenos ruminantes foram testados: o *scrapie* atípico foi identificado em 328 pequenos ruminantes (326 ovinos e dois caprinos). O perfil eletroforético da PrP^{sc} mostrou-se idêntico àquele observado na Nor98, com 3 ou 5 bandas entre os 30 e os 12 kDa, confirmando que em Portugal o *scrapie* atípico é o Nor98 (Orge et al., 2010). A genotipagem para o *prnp* nos casos de *scrapie* atípico revelou uma variedade de genótipos, incluindo ARR/AFRQ, ARR/ARR, ARQ/AFRQ e AFRQ/AFRQ. Estes resultados vieram confirmar a prévia associação a genótipos raramente atribuídos ao *scrapie* clássico (Orge et al., 2004). Ainda neste estudo, 12 ovinos resultaram positivos para o *scrapie* clássico por teste rápido, histopatologia e *Western Immunoblotting*, representando a identificação pela primeira vez desta doença em Portugal. Foi observada vacuolização neuronal no núcleo motor dorsal do nervo vago e vacuolização do neurópilo ventralmente a esse núcleo, típicas de *scrapie* clássico. Todos os casos mostraram marcação intracelular específica (intra-neuronal e intraglial) e deposição extracelular em grânulos coalescentes, perineuronal e linear (Orge et al. 2010).

Enquanto o *scrapie* atípico/Nor98 se encontra disperso pelo país, o *scrapie* clássico acha-se confinado a dois rebanhos vizinhos de produção leiteira no interior- centro do país.

O *scrapie* atípico é então a TSE predominante em pequenos ruminantes no nosso país, diferentemente de outros países europeus aonde o *scrapie* clássico se tem revelado enzoótico ao longo de décadas (Orge et al., 2010).

1.4.8. Estratégias de controlo

A Comissão Europeia estabeleceu três estratégias para os dois tipos de *scrapie*: 1) *stamping out*: todos os animais de rebanhos positivos são abatidos e todos os adultos ou uma amostragem são testados; 2) abate seletivo: os animais são genotipados e aqueles com génotipos mais propensos ao *scrapie* clássico são destruídos e testados; 3) vigilância intensiva da exploração em que, durante 2 anos os animais adultos são testados, enviados para o matadouro e os encontrados mortos na exploração. A Itália aplicou um abate seletivo alargado em rebanhos positivos para o *scrapie* clássico. Dentro dos três tipos de estratégias, registam-se diferenças consoante os países. Algumas vezes os animais de rebanhos suspeitos tal como os de rebanhos contíguos são incluídos na estratégia de controlo. A idade mínima de animais testados também varia. A proporção de animais testados de entre os animais destruídos difere e, diferentes génotipos são escolhidos durante o abate seletivo e consequentemente testados. Também houve diferenças ao longo do tempo dentro dos próprios países. O *stamping out* foi aplicado em 5 países para o *scrapie* clássico e em 7 países para o *scrapie* atípico. O abate seletivo foi aplicado em 6 países para o *scrapie* clássico e em 8 países para o *scrapie* atípico. A vigilância intensiva foi aplicada num único país para o *scrapie* clássico e em 7 países para o *scrapie* atípico.

O controlo de movimentação animal aplicado inicialmente aos rebanhos com *scrapie* atípico foi recentemente levantado, visto que não representa factor de risco para este tipo de *scrapie*. Também se irá preconizar a certificação de rebanhos para o *scrapie* clássico, que permitirá valorizá-los nas trocas intra e extracomunitárias (Regulamento (CE) nº 630/2013 da Comissão, de 28 de junho de 2013).

2. PARTE II. TRABALHO EXPERIMENTAL

Este trabalho experimental foi desenvolvido nos setores de diagnóstico anatomohistopatológico e de TSEs do laboratório de Patologia do INIAV, durante o período de 1 de Junho de 2010 a 04 de Abril de 2011.

2.1. Objetivos

Através de estudos retrospectivos no Reino Unido, foi confirmada a existência de casos de *scrapie* atípico antes de 1998 (Bruce et al., 2007; Webb et al., 2009), sugerindo que esta forma não é nova e que estará relacionada com o aumento da vigilância e da maior sensibilidade dos meios de diagnóstico. Com o presente estudo pretendeu-se determinar a potencial ocorrência de *scrapie* em Portugal antes de 2002, reexaminando, pelos atuais métodos de diagnóstico, amostras de pequenos ruminantes arquivadas entre 1995-2002. Também se pretendeu contribuir para a caracterização epidemiológica desta doença no nosso país.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Caracterização da amostragem

Para este estudo foram selecionadas amostras de pequenos ruminantes incluídas no projeto PAMAF –IED 3021 intitulado “Estudo da Patologia do Sistema Nervoso Central nos Pequenos Ruminantes”, bem como de outros casos de ovinos e caprinos com sintomatologia nervosa arquivados no setor de diagnóstico anatomohistopatológico, Laboratório de Patologia do INIAV, entre os anos de 1995 e 2002.

O projeto PAMAF foi desenvolvido entre 1995-1998 em pequenos ruminantes com sinais clínicos de índole nervosa, cujo exame histopatológico para pesquisa de lesões de *scrapie* não revelou a vacuolização característica para esta doença.

A amostragem consistiu em blocos de parafina das seguintes regiões anatómicas do sistema nervoso central, por serem as mais afetadas pelo *scrapie* atípico, o de maior prevalência em Portugal:

- óbex;
- ponte;
- mesencéfalo;
- cerebelo;
- córtex cerebral.

Destes pequenos ruminantes selecionaram-se 305 animais, tendo sido encontrados 877 blocos de parafina correspondentes a 155 animais (150 ovinos e 5 caprinos). Nenhum bloco foi encontrado para análises com data de entrada do ano 2000.

No presente trabalho, todas estas amostras foram submetidas à técnica de imunohistoquímica para a deteção de PrP^{sc}.

Na tabela em anexo (Tabela 14), descreve-se a amostragem na sua totalidade por ordem cronológica, desde 1995 a 2002, bem como o número de blocos de parafina encontrados para cada animal; a espécie correspondente; a idade e a exploração, quando identificada, bem como os resultados relevantes obtidos para o SNC.

Em termos de distribuição geográfica dos animais analisados, a correspondência por Direção Regional de Agricultura (DRA), encontra-se indicada na tabela seguinte (Tabela 12):

Tabela 12 - Descrição geográfica da amostragem de acordo com a DRA de origem dos animais

DRA	Número de animais	Número de blocos de parafina
DRA Norte	0	0
DRA Centro	32 (31 ovinos, 1 caprino)	183 (178 ovinos, 5 caprinos)
DRA Lisboa e Vale do Tejo	27 (ovinos)	148 (ovinos)
DRA Alentejo	94 (90 ovinos, 4 caprinos)	612 (593 ovinos, 19 caprinos)
DRA Algarve	2 (ovinos)	24 (ovinos)
Total	155 (150 ovinos, 5 caprinos)	877 (853 ovinos, 24 caprinos)

2.2.2. A técnica de Imunohistoquímica (IHQ)

Este trabalho consistiu na efectivação de 17 ensaios de imunohistoquímica de acordo com o procedimento de ensaio em utilização no setor de diagnóstico das EETs, método acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), o organismo nacional de acreditação requerido pelo Regulamento (CE) n.º 765/2008. O IPAC é membro da infra-estrutura europeia de acreditação, a *European Cooperation for Accreditation* (EA), bem como das estruturas mundiais de acreditação, a *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) e o *International Accreditation Forum* (IAF).

Este método de IHQ é indireto, recorrendo ao complexo avidina-biotina (ABC) conjugado com a enzima peroxidase. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogénio, que conferiu cor castanha à imunomarcação e a coloração de fundo foi feita com Hematoxilina de Mayer.

O anticorpo anti-PrP usado foi o monoclonal (MAb) 2G11 dirigido contra o epitopo 146-R¹⁵⁴R¹⁷¹-182 da PrP, comercializado pelo Instituto Pourquier. A seleção deste anticorpo baseou-se no facto deste ter evidenciado melhores resultados de imunomarcação para a detecção de PrP^{sc} em casos de *scrapie*, no âmbito da avaliação efetuada pelo projecto europeu FAIR CT 98-7021, em que um dos objectivos foi padronizar a técnica de imunohistoquímica nos vários laboratórios de referência para o diagnóstico das TSEs.

As etapas do procedimento de ensaio incluíram:

- a) Execução de cortes de 4 µm de espessura colhidos em lâminas adesivadas (Superfrost Plus®);
- b) Secagem dos cortes a 50° C durante a noite;
- c) Desparafinação dos cortes em dois banhos de xilol 3 minutos (min) cada;
- d) Rehidratação dos cortes: álcool etílico absoluto (duas vezes, durante 3 min); álcool etílico a 90% (v/v) (durante 1 minuto); álcool etílico 70% (durante 1 min);
- e) Recuperação antigénica: imersão em ácido fórmico a 98% durante 30 min, seguida de passagem dos cortes em água corrente (5 min) e em água destilada (5 min); tratamento térmico a 121°C (câmara de pressão PASCAL da DakoCytomatation) com tampão citrato (10 mM; pH 6.1) durante 30 min;
- f) Arrefecimento dos cortes em água destilada (5 min);
- g) Incubação com Solução de Bloqueio da atividade da Peroxidase Endógena (H₂O₂ a 3% (v/v) em metanol) durante 30 min;
- h) Passagem dos cortes em água corrente (5 min);
- i) Passagem dos cortes em TBS (50 mM TRIZMA® base; 0.8% NaCl; pH 7,6) (5min);
- j) Montagem das lâminas nos suportes *Coverplate™Shandon* e colocação no dispositivo *Sequenza®*;
- k) Incubação com Solução de Bloqueio de reacções inespecíficas (soro normal de cavalo 20% (v/v) em TBS) à temperatura ambiente 30 min;
- l) Incubação com o anticorpo primário MAb 2G11 (diluição 1/200 em TBS com 10% (v/v) de soro normal de cavalo) a temperatura ambiente durante 60 min;
- m) Lavagem com TBS por 3 vezes 5 min;

- n) Incubação com anticorpo secundário biotilado de cavalo anti-murganho (Vector®), (diluição 1/200 em TBS com 10% de soro de cavalo) durante 30 min;
- o) Lavagem com TBS por 3 vezes 5 min;
- p) Incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (kit *Vectastain ABC Elite*, Vector®) durante 30 min;
- q) Lavagem com TBS por 3 vezes 5 min;
- r) Revelação com DAB e Peróxido de Hidrogénio(Vector®) durante 5 min;
- s) Lavagem em água corrente durante 5 min;
- t) Coloração de contraste com Hematoxilina de Mayer durante 1 min;
- u) Lavagem em água corrente (azular);
- v) Desidratação dos cortes: álcool etílico a 90%; álcool etílico absoluto e xilol durante 1 min cada;
- a) Montagem das lâminas com lamela e meio de montagem *Entellan*®

2.2.3. Condições de Leitura

Todos os cortes histológicos foram observados por microscopia óptica (Microscópio Olympus®, BX60F5) e as imagens captadas por um sistema digital através do programa de análise de imagem AnalySIS® 3.0, Soft Imaging System GmbH.

Em todos os ensaios de imunohistoquímica foram utilizados um controlo negativo e um positivo. O controlo negativo pertencia a um animal negativo ao teste rápido TeSeE BIORAD sem qualquer padrão de imunomarcção.

O controlo positivo proveio de um animal com resultado positivo ao teste rápido TeSeE BIORAD, exibindo imunomarcção e um perfil eletroforético de PrP^{sc} característicos do *scrapie* atípico (confirmados através dos métodos de diagnóstico complementar *Western ImmunoBlotting* e IHQ).

De acordo com a região do SNC, considerou-se característica de PrP^{sc} de *scrapie* atípico/Nor98 a seguinte imunomarcção (Benestad et al., 2003, 2008; Orge et al., 2004, 2010):

- no córtex cerebral – partículas ou grânulos, dispendo-se numa distribuição laminar nas camadas internas;
- no cerebelo – partículas ou grânulos dispersos na camada granulosa e, também, na camada molecular com uma distribuição sináptica;
- no mesencéfalo – podem verificar-se partículas ou grânulos dispersos na substância cinzenta central;

- na região do óbex não se detecta PrP^{sc} no núcleo motor dorsal do nervo vago e as partículas ou grânulos estão restritos ao neurópilo do núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo e/ou do núcleo do trato solitário;

- em qualquer das regiões supramencionadas também se pode observar na substância branca grânulos, por vezes, depositados em anel ou semi-anel (designada de imunomarcacão globular).

A observacão de imunomarcacão de PrP^{sc} foi efetuada segundo os itens da morfologia, localizacão e intensidade, a qual foi subjetivamente estimada de acordo com os seguintes critérios (Hardt *et al.*, 2000):

- 0: sem marcacão;

- 1: fraca;

- 2: moderada;

- 3: forte marcacão.

2.3.Resultados

Os resultados do procedimento técnico de imunohistoquímica encontram-se relatados na tabela 13 por ordem cronológica, ao longo dos 17 ensaios realizados, sendo descritos o número da análise em causa (nº análise/ano), a espécie correspondente, a área do sistema nervoso central (SNC) analisada e o resultado imunohistoquímico para cada análise. Incluíram-se ainda no campo do resultado da análise observacões relevantes, como por exemplo a ocorrência de artefactos.

As análises repetidas por perda de corte durante os ensaios ou para esclarecimento de artefatos encontram-se assinaladas.

A maior parte dos animais analisados correspondeu a análises do ano 1999 (n=117), contrastando com os restantes anos (1995 n=2; 1996 n=11; 1997 n=3; 1998 n=3; 2001 n=3 e 2002 n=4); o óbex, o cerebelo e o córtex cerebral foram as regiões neuroanatômicas mais representadas, correspondendo também às áreas utilizadas para o diagnóstico de scrapie atípica/Nor98.

Em todos os ensaios, não se detetou qualquer imunomarcacão no controlo negativo (Figura 3) e o controlo positivo apresentou a morfologia, a distribuicão e a intensidade de imunomarcacão de PrP^{sc} esperadas (Figuras 4a-d e 5), de acordo com o descrito para a forma atípica/Nor98, pelo que todos os ensaios foram validados.

A imunomarcacão consistiu numa forte marcacão em partículas ou grânulos de marcacão observadas ao nível da camada molecular (Figuras 4a-c), numa marcacão globular moderada a

forte ao nível da substância branca do cerebelo (Figura 4d), assim como numa moderada marcação em grânulos na granulosa do cerebelo (Figura 5).

Em alguns cortes foram observados alguns artefactos, mas que no entanto não afetaram o método de deteção de PrP^{sc} por imunohistoquímica (Figuras 6;7a e 7b).

Em 150 animais testados, não foi detetada imunomarcação característica (0 - sem marcação correspondendo a um resultado Negativo (Neg). Nos restantes 5 animais, todos da espécie ovina, foi observada uma imunomarcação fraca (intensidade 1 de marcação), interpretando-se os resultados como Inconclusivos. (Tabela 13; Figuras 8-14).

A referida imunomarcação observada consistiu em partículas dispersas ao nível da camada molecular do cerebelo dos ovinos **1549/96** (Tabela 3-1º ensaio; Figura 8), **2219/99** (Tabela 3-17º ensaio; Figuras 9a e 9b) e **2475/99** (Tabela 3-13º ensaio; Figuras 10a e 10b). O ovino **10884/99** apresentou também uma fraca imunomarcação em grânulos agregados na camada granulosa do cerebelo (Tabela 3-11º ensaio; Figuras 11a e 11b).

No córtex cerebral dos ovinos **11511/99** (Tabela 3-15º ensaio; Figuras 12a e 12b) e **10884/99** (Tabela 3-11º ensaio Figura 13) detetaram-se partículas finas orientadas em linhas.

A imunomarcação na substância branca descrita como característica do *scrapie* atípico/Nor98 foi apenas observada, também de uma forma incipiente, no ovino **1549/96** (Figura 14).

Ao nível do óbex não foi detetada qualquer imunomarcação.

Tabela 13- Identificação das amostras e resultados obtidos em cada ensaio de Imunohistoquímica

Data IHQ	Espécie	Nº análise	Resultado Imunohistoquímica				Observações	
			Região Neuroanatômica					
			Obex	Ponte	Mesencéfalo	Cerebelo		Cortex cerebral
1º ENSAIO 17-09-2010	ovino	3863/95				Neg	Neg	Artefatos congelação
	ovino	10509/95					Neg	
	ovino	342/96			Neg		Neg	Artefatos congelação
	ovino	1133/96				Perda de corte	Neg	Vacuolização artefactual
	ovino	1542/96	Neg				Neg	Vacuolização substância cinzenta
	ovino	1546/96	Neg		Perda de corte	Inconclusivo		
	ovino	2062/96	Neg			Neg		
	ovino	2667/96	Neg		Neg	Neg		
	ovino	4145/96			Neg	Neg		
	ovino	5087/96	Neg					Artefatos congelação
	ovino	5089/96	Neg			Neg		
	ovino	5091/96	Neg				Neg	
ovino	2224/97	Neg					Artefatos congelação	
2º ENSAIO 30-09-10	ovino	5361/96	Neg		Neg	Neg		
	ovino	1500/97		Neg		Neg		Artefatos congelação
	ovino	3012/97	Neg			Neg		
	ovino	3980/98					Neg	Artefatos congelação
	ovino	6873/98				Neg	Neg	
	ovino	7796/98					Neg	Artefatos congelação
	ovino	3202/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3448/99	Neg			Neg		
3º ENSAIO 12-10-10	ovino	3038/99	Neg			Neg		
	ovino	3199/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3205/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3574/99	Neg			Neg		Artefatos congelação
	ovino	3791/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4017/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4250/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	5095/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10520/99	Neg			Neg	Neg	
4º ENSAIO 13-10-10	ovino	1133/96*				Neg		
	ovino	2224/97*				Neg		
	ovino	1458/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3906/99	Neg			Neg	Neg	
	caprino	3908/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3909/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4021/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4023/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4257/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10881/99	Neg			Neg	Neg	
5º ENSAIO 3-11-10	ovino	2218/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	2380/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3437/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3441/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3448/99*				Neg	Neg	
	ovino	3582/99				Neg		
	ovino	3069/01	Neg				Neg	
	ovino	3070/01	Neg			Neg		
	ovino	3071/01	Neg					
	ovino	2582/02	Neg				Neg	Artefatos congelação
6º ENSAIO 9-11-10	ovino	3487/02				Neg	Neg	
	ovino	3915/02					Neg	
	ovino	2215/99	Perda de corte		Perda de corte		Neg	
	ovino	2474/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3440/99	Neg				Neg	
	ovino	3443/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3785/99	Neg			Neg	Neg	
ovino	9768/99	Neg			Neg	Neg		
ovino	4676/02			Neg	Neg	Neg		

Neg- ausência de marcação (0); Inconclusivo- imunomarcação fraca (1); * Ensaio de repetição

Área não disponível

Tabela 13- Identificação das amostras e resultados obtidos em cada ensaio de Imunohistoquímica (Continuação)

Data IHQ	Espécie	Nº análise	Resultado Imunohistoquímica				Observações	
			Obex	Região Neuroanatômica				
				Ponte	Mesencéfalo	Cerebelo		Cortex cerebral
7ºENSAIO 10-11-10	ovino	3442/99	Neg			Neg	Neg	
	caprino	3907/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3910/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4019/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	9764/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10880/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11158/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11279/99	Neg			Neg	Neg	
8ºENSAIO 11-11-10	ovino	2216/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4018/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4026/99	Neg			Neg		
	ovino	4249/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4254/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	9765/99	Neg		Perda de corte	Neg	Neg	
	ovino	10882/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11278/99	Neg			Neg	Neg	
9ºENSAIO 16-11-10	ovino	11282/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11777/99	Neg				Perda corte	
	ovino	3204/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3905/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3911/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4020/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	9766/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10521/99	Neg			Neg	Neg	
10ºENSAIO 17-11-10	ovino	11284/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11512/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11513/99	Neg			Neg	Neg	Artefatos congelação; secção obex apenas hemiplano
	ovino	3040/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3206/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3447/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3787/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	5091/99	Neg			Neg	Neg	
11ºENSAIO 18-11-10	ovino	5097/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10886/99	Neg			Neg	Perda de corte	Artefatos congelação
	ovino	11160/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	11285/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3581/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3792/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3793/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4022/99	Neg			Neg	Neg	
12ºENSAIO 23-11-10	ovino	4252/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4255/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10883/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	10884/99	Neg		Perda de corte	Inconclusivo	Inconclusivo	
	ovino	11510/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3037/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3576/99	Neg		Neg	Neg		
	ovino	3577/99	Neg			Neg	Neg	
12ºENSAIO 23-11-10	ovino	3784/99	Neg		Neg	Neg	Neg	
	ovino	4024/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4251/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	4253/99	Neg			Neg	Neg	
	ovino	3579/99*	Neg			Neg	Neg	

Neg- ausência de marcação (0); Inconclusivo- imunomarcção fraca (1); * Ensaio de repetição

Área não disponível

Tabela 13- Identificação das amostras e resultados obtidos em cada ensaio de Imunohistoquímica (Continuação)

Data IHQ	Espécie	Nº análise	Resultado Imunohistoquímica				Observações
			Região Neuroanatômica				
			Obex	Ponte	Mesencéfalo	Cerebelo	
13ºENSAIO 23-03-11	ovino	3789/99				Neg	
	ovino	3580/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2215/99*	Neg		Neg		Neg
	ovino	11777/99*					Neg
	ovino	10886/99*	Neg				Neg
	ovino	11159/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	3783/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	3445/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2475/99	Neg			Inconclusivo	Neg
	ovino	5100/99	Neg			Neg	Neg
14ºENSAIO 24-03-11	ovino	10884/99*			Neg		
	ovino	10888/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	1546/96*			Neg		
	ovino	9765/99*			Neg	Neg	
	ovino	4025/99	Neg				Neg
	ovino	3789/99*	Neg				Neg
	ovino	3790/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	11283/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	3203/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	11775/99	Neg			Neg	Neg
15ºENSAIO 24-03-11	ovino	3582/99*				Neg	
	ovino	1283/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	11157/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	11511/99	Neg			Neg	Inconclusivo
	ovino	3439/99	Neg		Neg	Neg	Neg
	ovino	3438/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	5098/99	Perda de corte			Neg	Neg
	ovino	11159/99*				Neg	Neg
	ovino	3573/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	3197/99				Neg	Neg
16ºENSAIO 30-03-11	ovino	3039/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2216/99*			Neg	Neg	
	ovino	3578/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	3489/99					Neg
	caprino	10606/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	3788/99	Neg			Neg	Neg
	caprino	3782/99	Perda de corte			Neg	Perda de corte
	ovino	3786/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	5096/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2477/99			Neg	Neg	Neg
17ºENSAIO 05-04-11	ovino	10885/99				Neg	Neg
	ovino	11514/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	5098/99*	neg				
	ovino	3444/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	10887/99	Neg			Neg	Neg
	caprino	3782/99*	Neg				Neg
	ovino	11774/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	11161/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2756/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2478/99	Neg			Neg	Neg
17ºENSAIO 05-04-11	ovino	2476/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2222/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2221/99	Neg			Neg	Neg
	ovino	2219/99	Neg			Inconclusivo	Neg
	ovino	3201/99	Neg				Neg

Neg- ausência de marcação (0); Inconclusivo- imunomarcção fraca (1); * Ensaio de repetição

Área não disponível



Figura 3 – Controlo negativo (análise 15593/08 do 2º ensaio) – óbex, núcleo motor dorsal do vago. Ausência de marcação específica; x200.

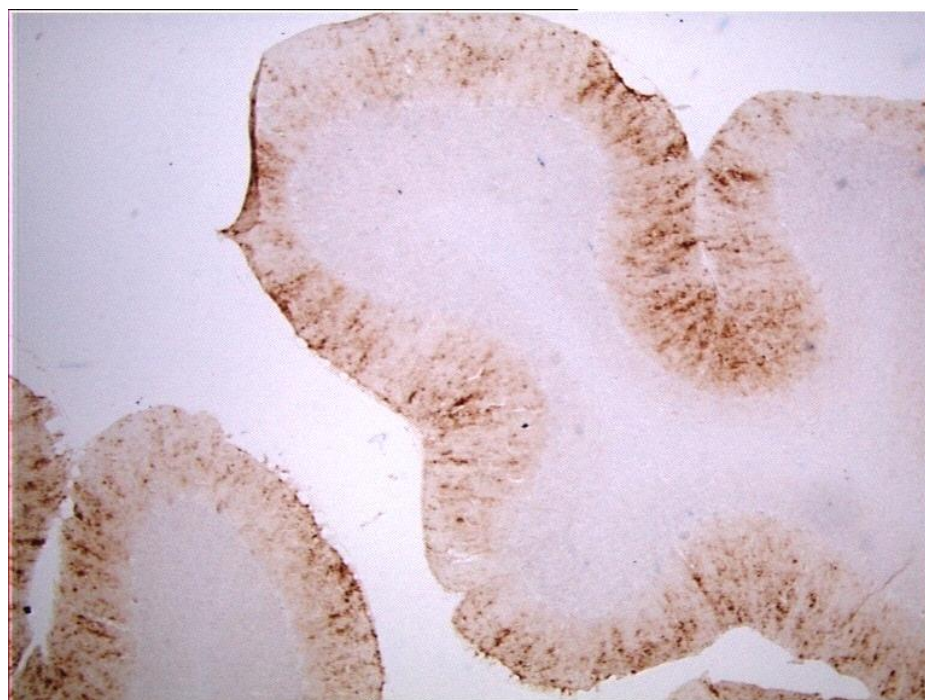


Figura 4a- Controlo positivo – cerebello (análise 32458/10 controlo do 17º ensaio)
A imunomarcção específica para a PrP^{sc} observada na camada molecular do cerebello; x40.



Figura 4b- Controle positivo – camada molecular do cerebelo (análise 32458/10 controle do 17º ensaio)
A deposição de PrP^{Sc} distribui-se na margem da camada molecular; x100.

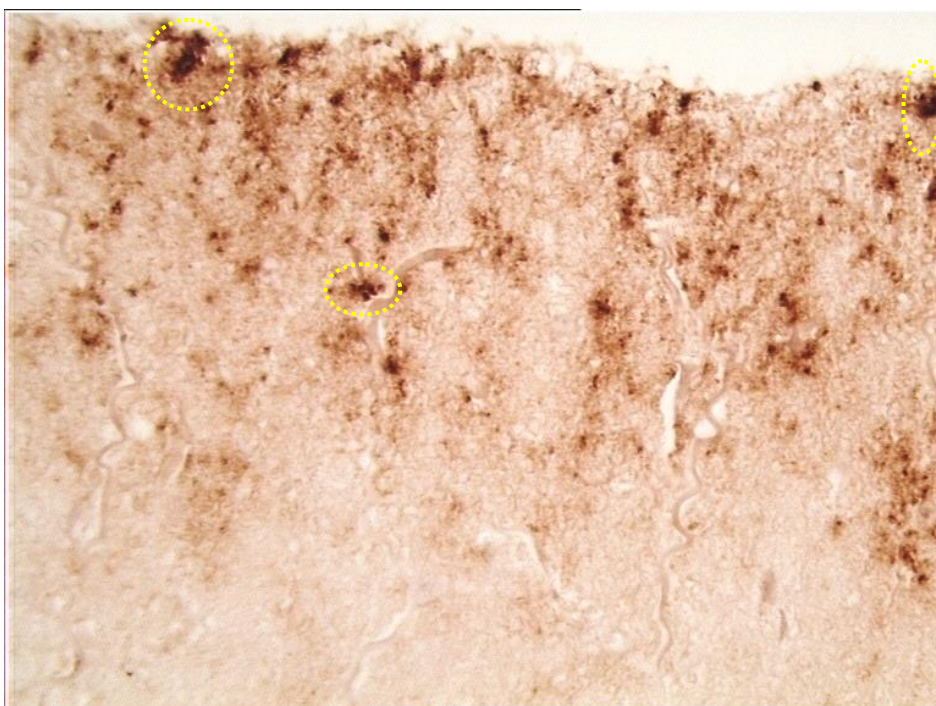


Figura 4c- Controle positivo-camada molecular do cerebelo (análise 32458/10 controle do 17º ensaio) – pormenor de 4b.
Detalhe da figura 4b para observação dos grânulos de imunomarcção de PrP^{Sc} ao nível da camada molecular do cerebelo característica do scrapie atípico/Nor98, evidenciando alguns agregados (áreas assinaladas);x400.

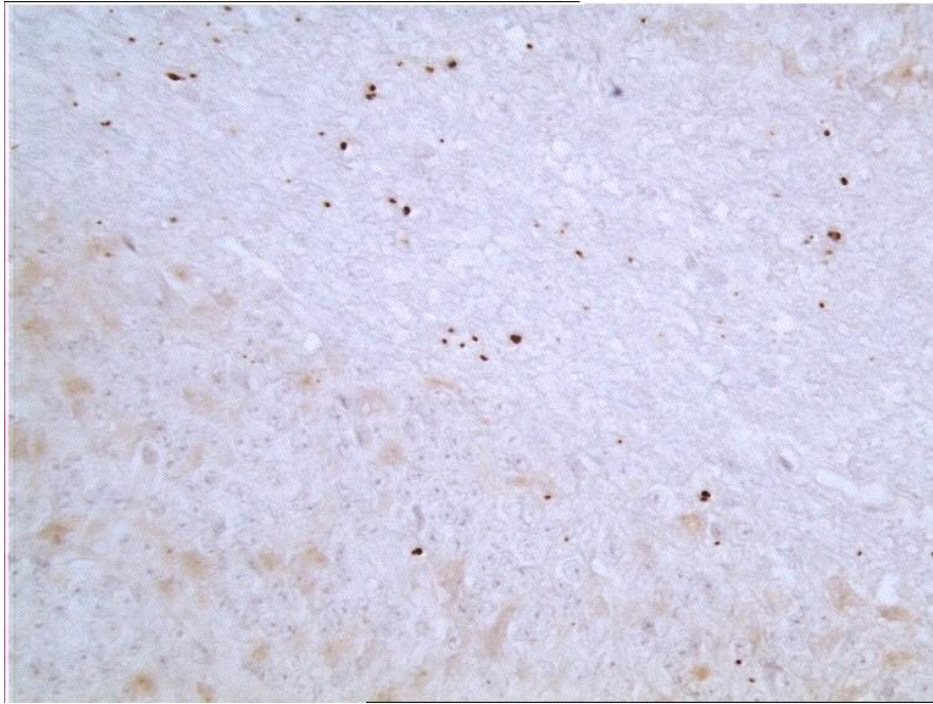


Figura 4d – Controlo positivo – cerebello, substância branca (análise 32458/10 controlo do 17º ensaio). Destaca-se a imunomarcção globular dispersa na substância branca do cerebello, embora haja moderada marcação ao nível da camada granulosa; x400.

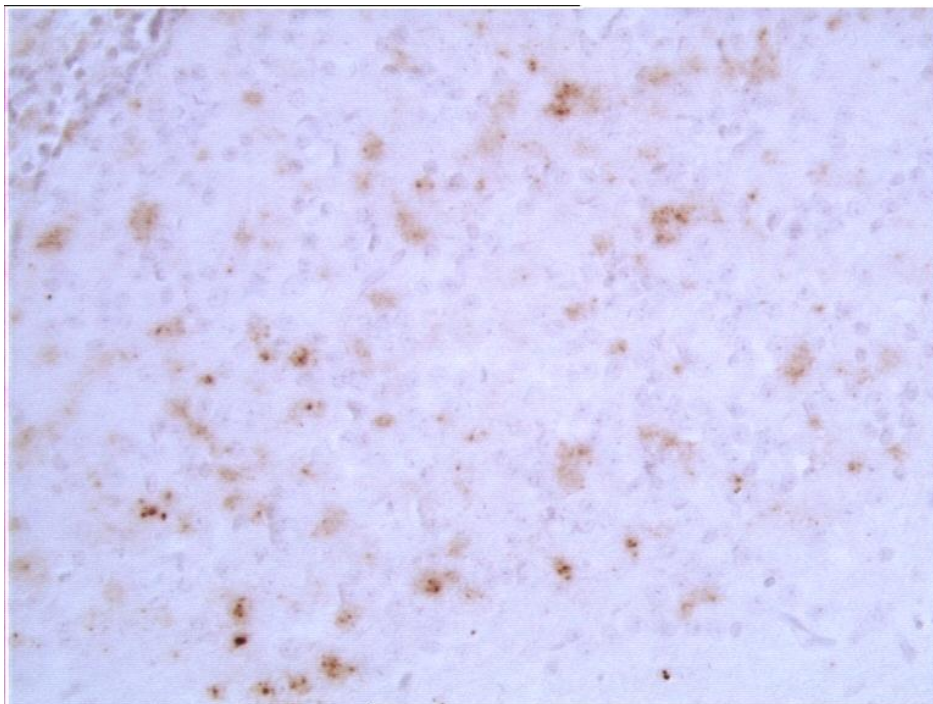


Figura 5 – Controlo positivo – cerebello, camada granulosa (análise 13026/08 controlo do 2º ensaio). Detalhe da imunomarcção granular observada ao nível da camada granulosa; x400.

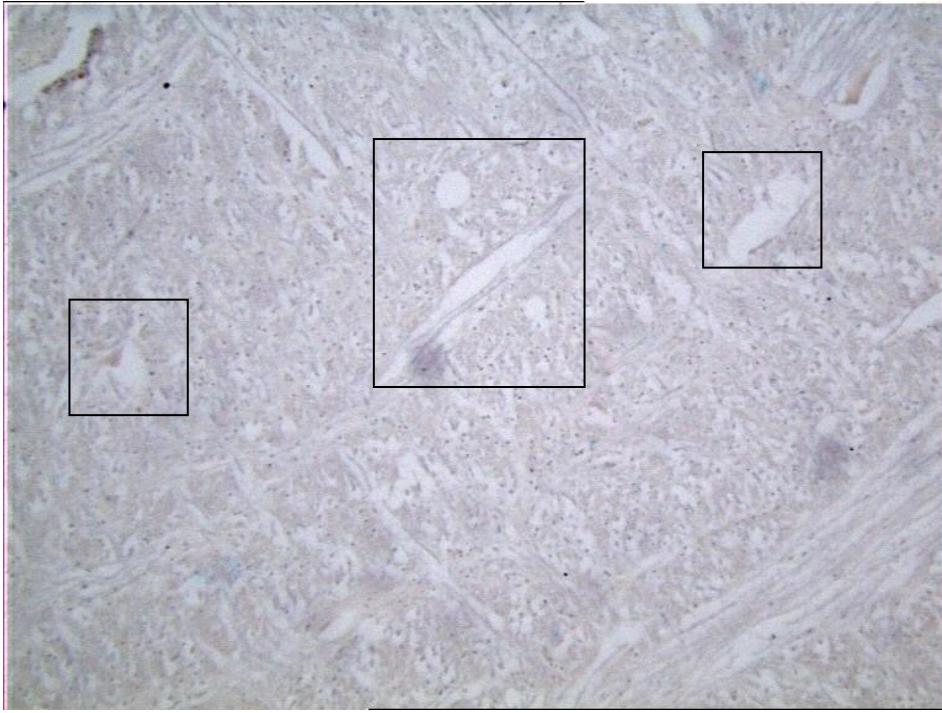


Figura 6 – Artefactos de congelação – substância branca ao nível córtexcerebral (análise 3863/95).
Análise negativa, mas com estrias e vacúolos de congelação (áreas delimitadas); x100.

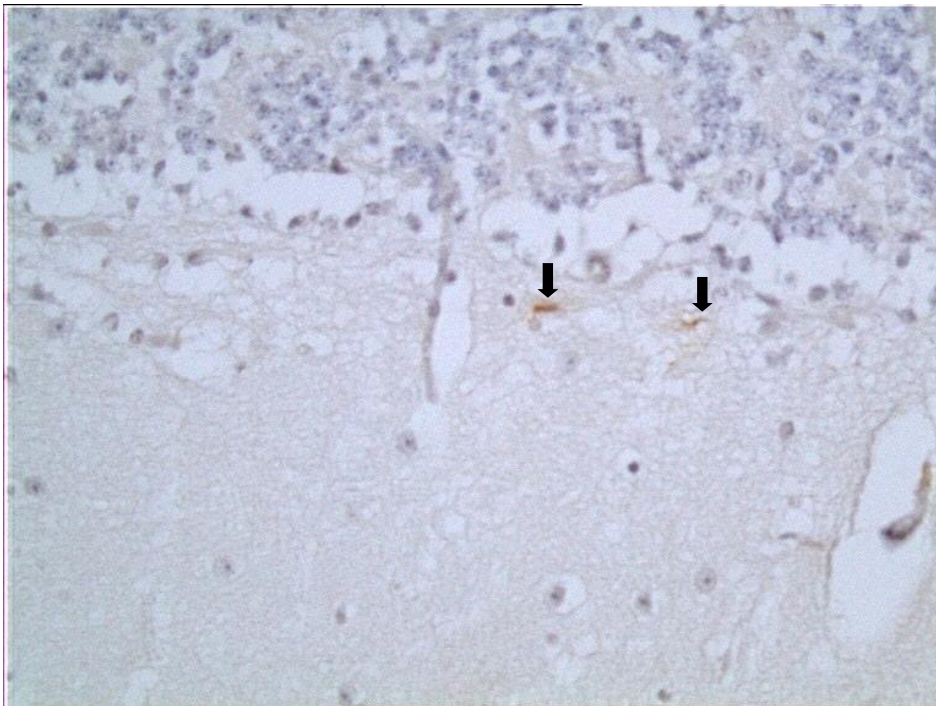


Figura 7a –Artefactos de marcação no cerebello (análise 1546/96).
Secção onde se notam duas situações suspeitas de marcação (setas) que se comprovaram estar fora do plano de corte; x400.

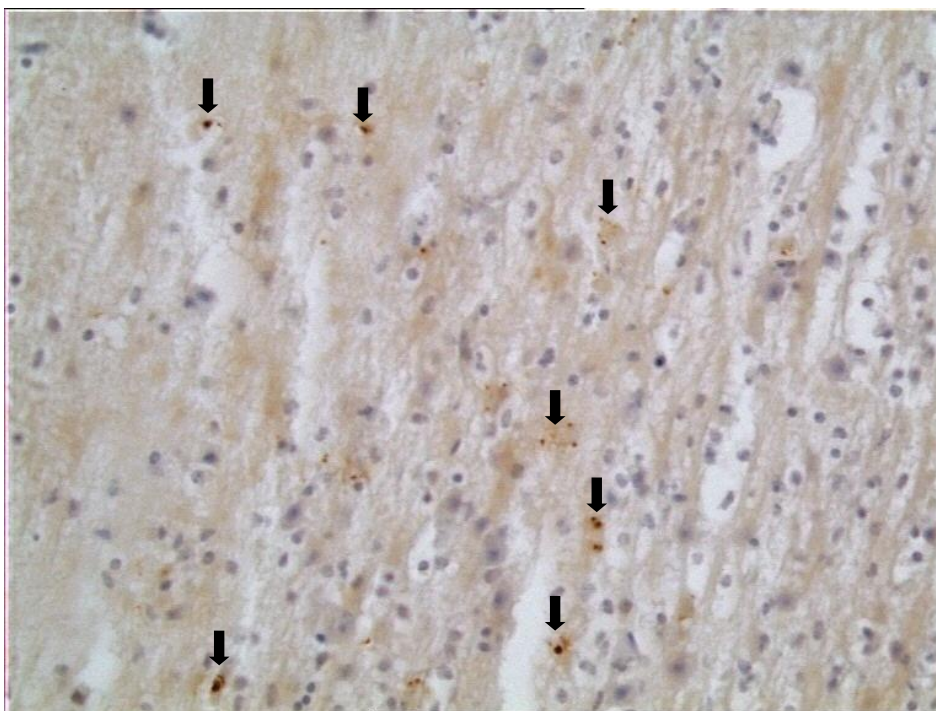


Figura 7b – Artefactos de marcação observados noutra área da secção de 7a (análise 1546/96 cerebello).

A mesma secção, mas noutra área, notando-se um ponteados (setas) que não é marcação específica para a PrP^{sc}, pois encontra-se num segundo plano de corte;x400.

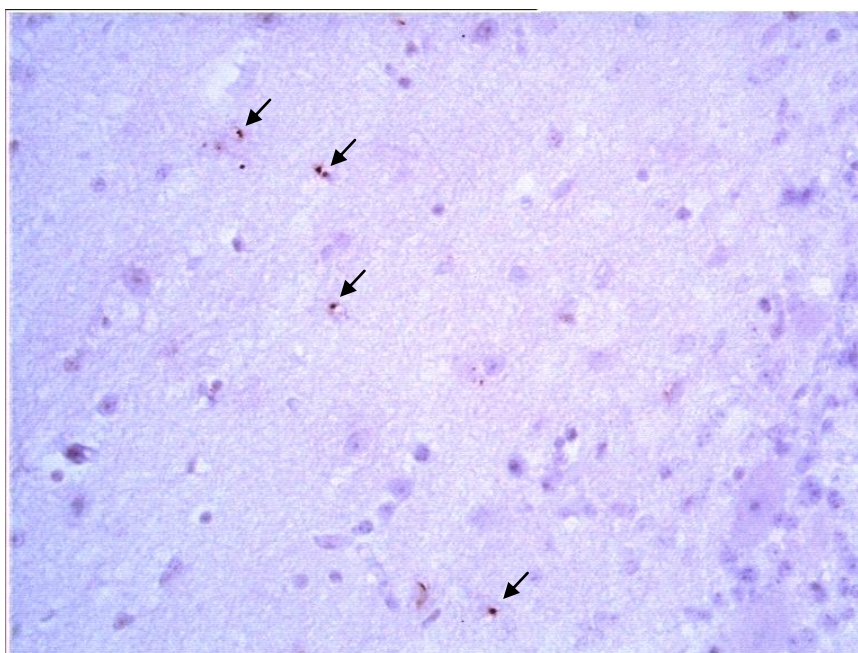


Figura 8 – Imunomarcção no cerebello do ovino 1546/96.

Discreta imunomarcção em partículas (setas) na camada molecular do cerebello- resultado inconclusivo ; x400.

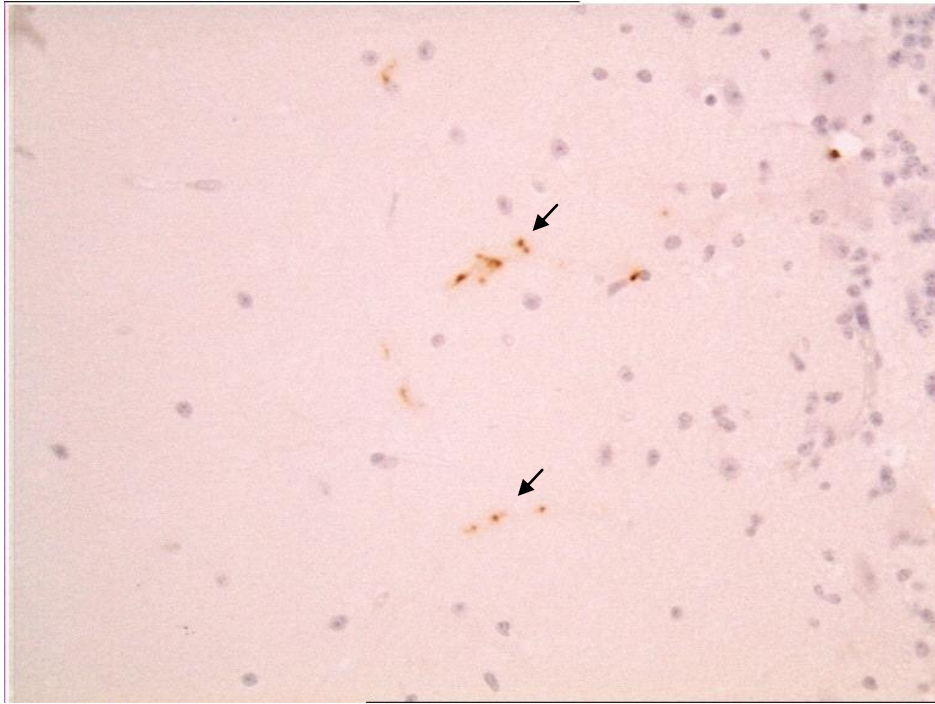


Figura 9a – Imunomarcacão no cerebello do ovino 2219/99.
Partículas dispersas (setas) na camada molecular - resultado inconclusivo; x400.

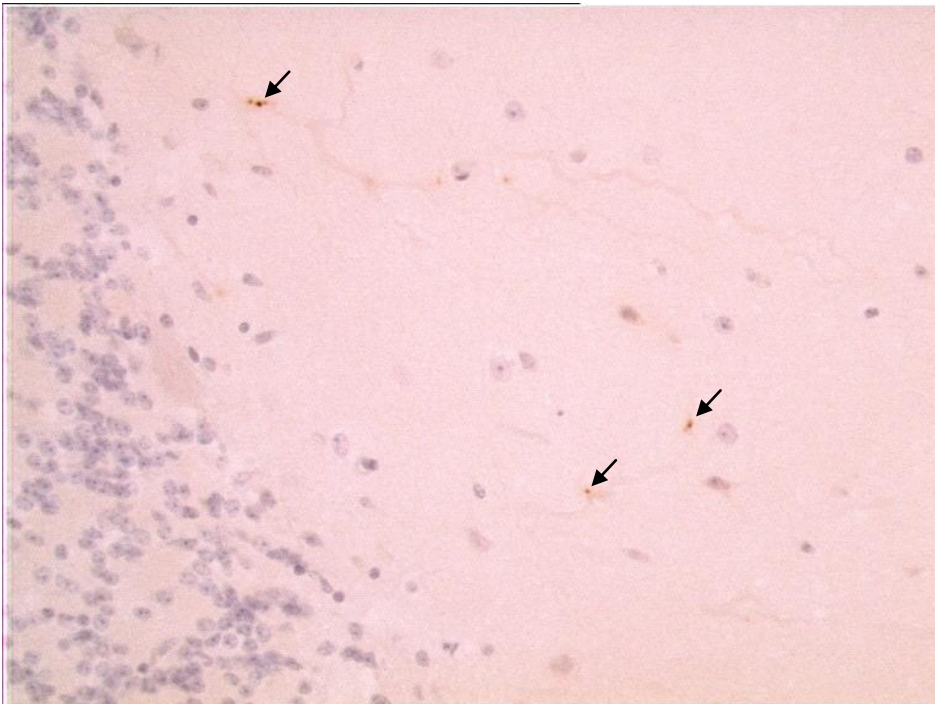


Figura 9b – Partículas de imunomarcacão noutra área de observacão da secção do cerebello do ovino 2219/99.
Discreta imunomarcacão em partículas (setas) na camada molecular; x400.

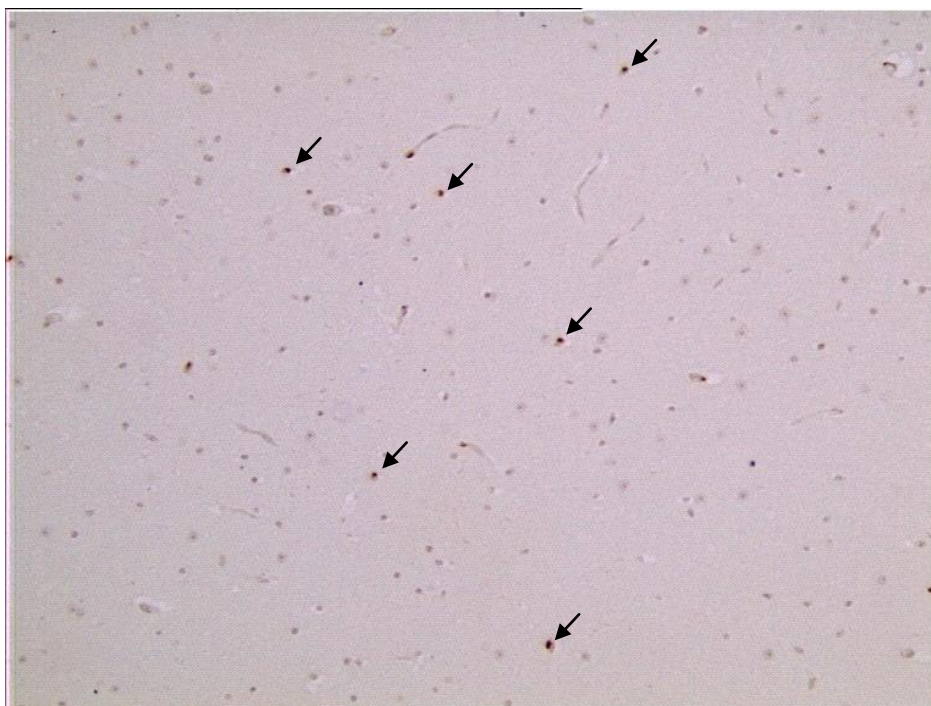


Figura 10a –Imunomarcção em partículas dispersas (setas) na camada molecular do cerebelo do ovino 2475/99 – resultado inconclusivo; x200.

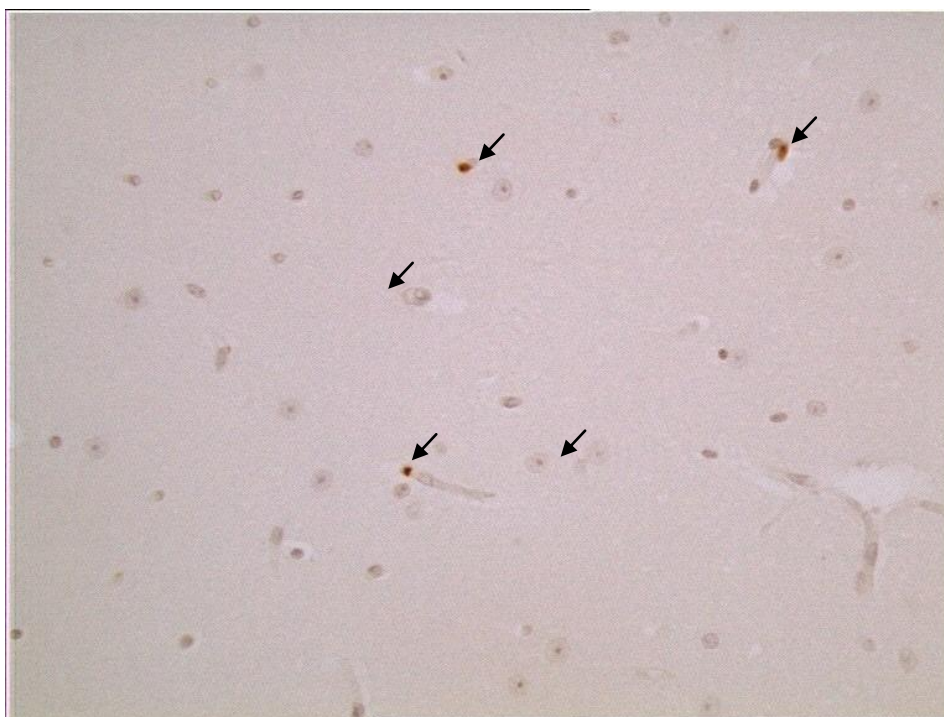


Figura 10b – Camada molecular do cerebelo do ovino 2475/99. Pormenor da figura 10a;x400.

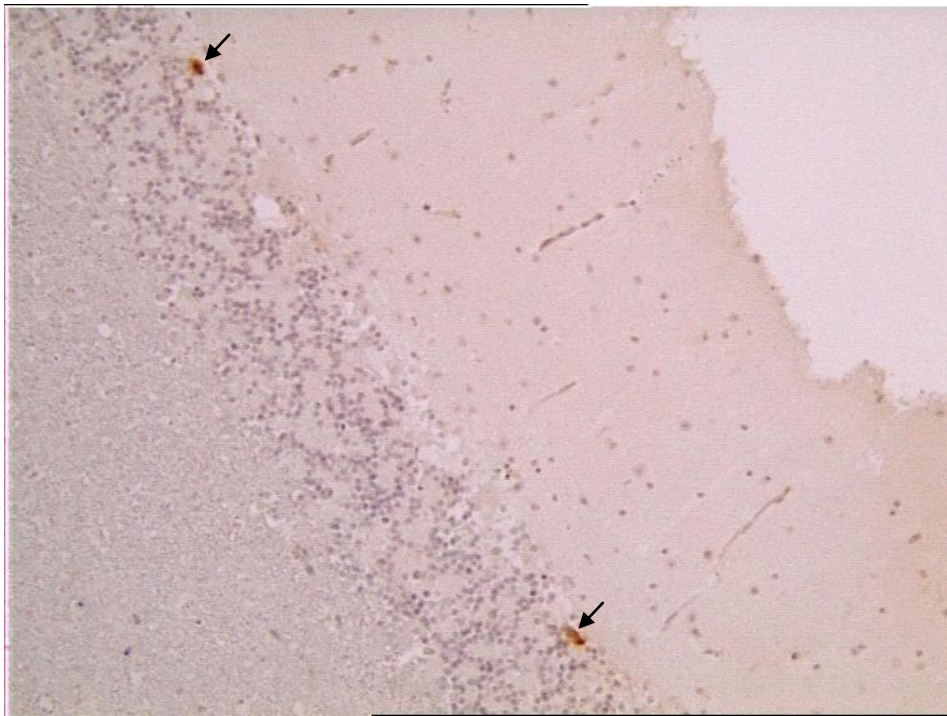


Figura 11a – Imunomarcação em grânulos agregados (setas) na camada granulosa do cerebelo do ovino 10884/99 – resultado inconclusivo; x200.

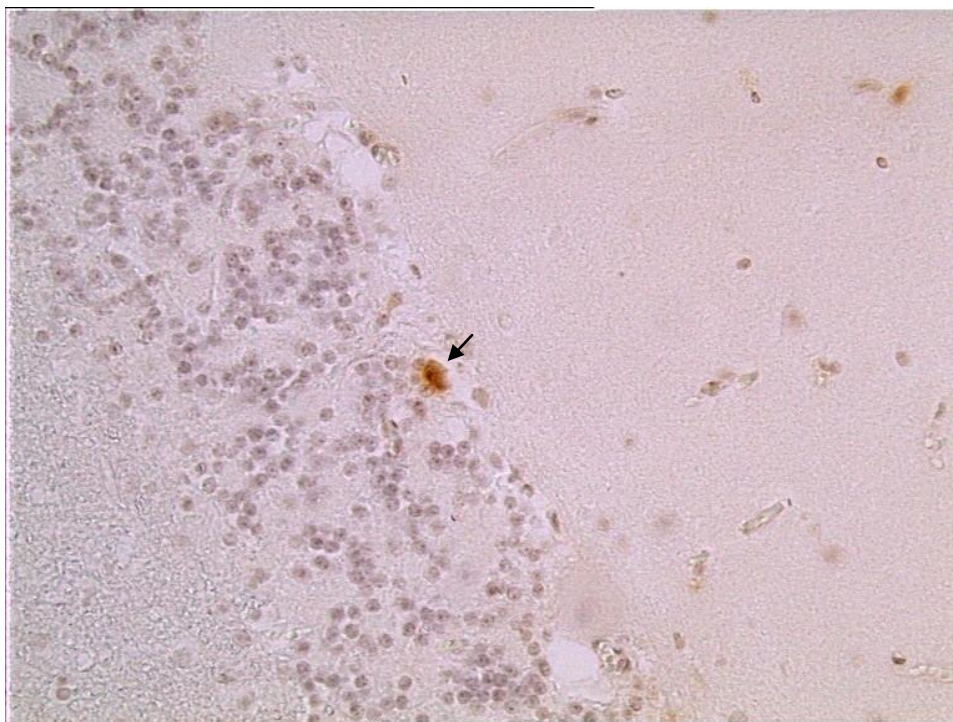


Figura 11b –Camada granulosa do cerebelo do ovino 10884/99. Pormenor da figura 11a; x400.

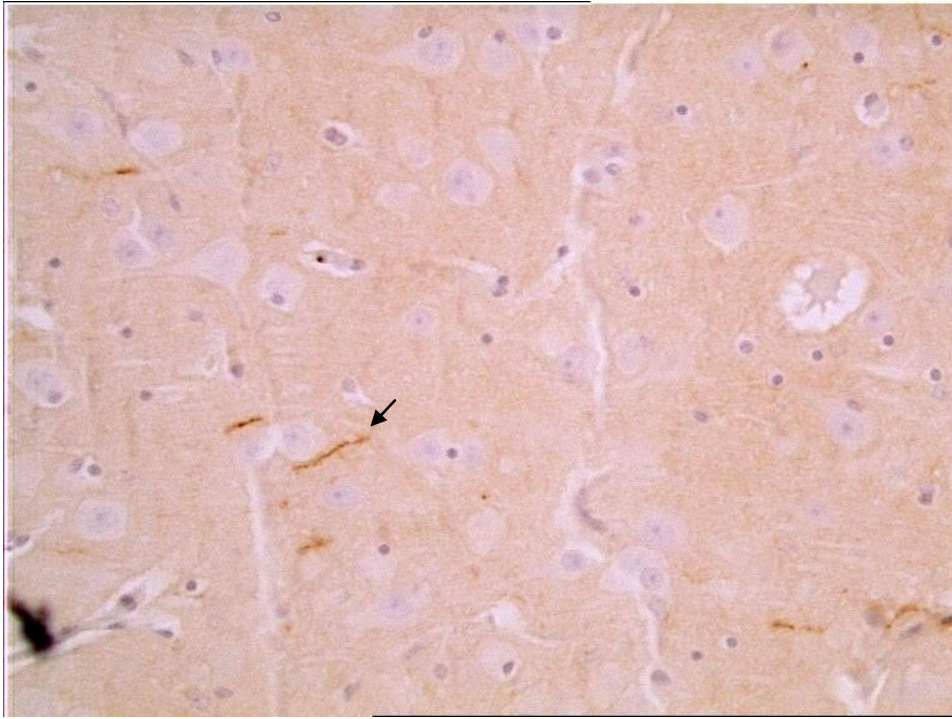


Figura 12a– Imunomarcção no córtex cerebral do ovino 11511/99. Notam-se partículas de imunomarcção distribuídas em linhas (seta) ao longo do corte- resultado inconclusivo; x400.

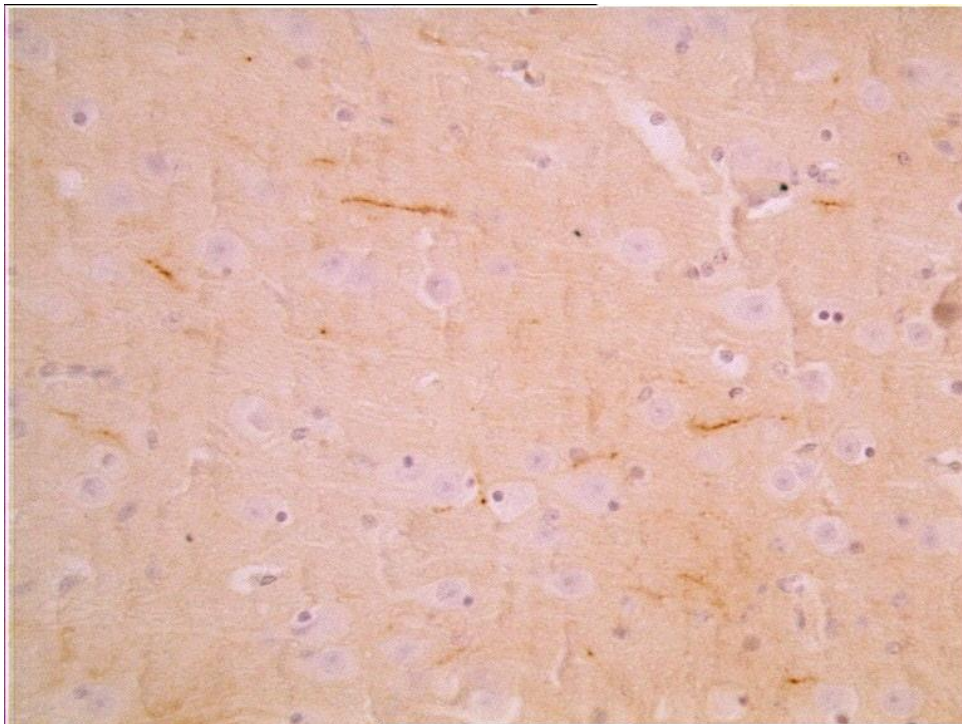


Figura 12b –Córtex cerebral do ovino 11511/99. Outra área da secção da figura 12a; x400.

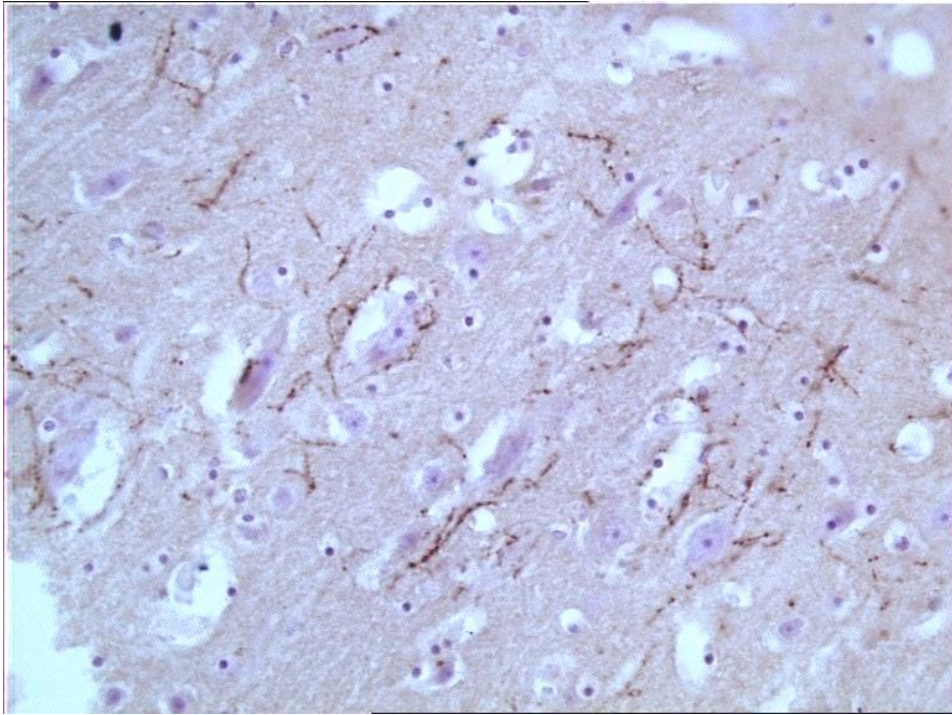


Figura 13 –Imunomarcção em linhas no córtex cerebral do ovino 10884/99. Resultado inconclusivo; x400.

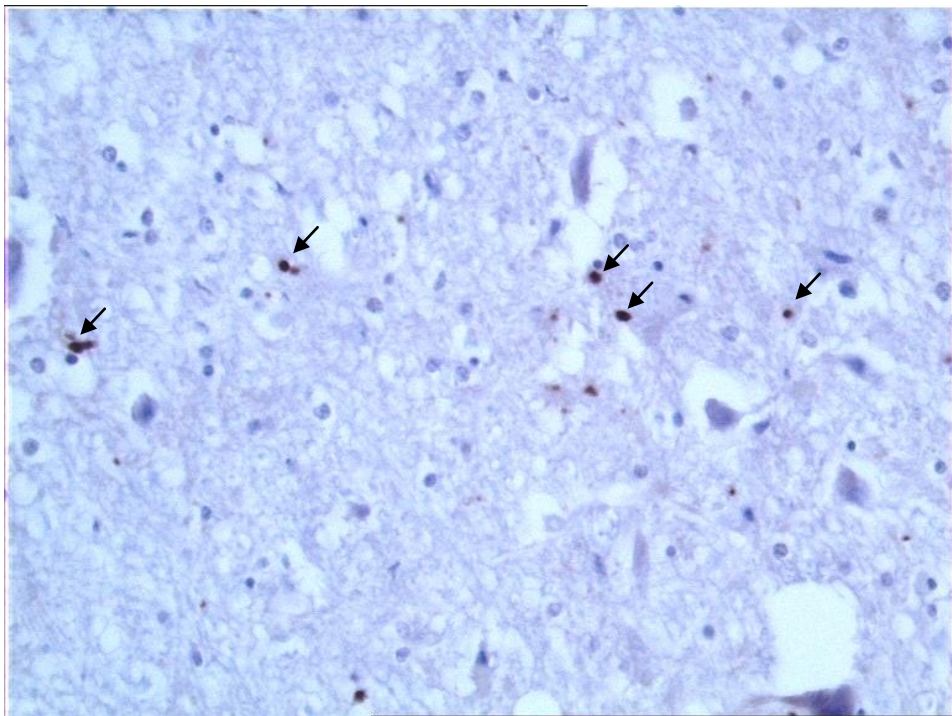


Figura 14 – Imunomarcção na substância branca do cerebelo do ovino 1546/96. Presença de várias grânulos de imunomarcção (setas)-resultado inconclusivo; x400.

2.4. Discussão

O *scrapie* é uma doença muito complexa. Do ponto de vista científico, a etiopatogenia carece melhor definição, a via de transmissão natural não está completamente esclarecida, não há medidas de prevenção eficazes, não há tratamento, nem há testes práticos em vida e efetivos para os animais afetados quer com doença clínica ou assintomáticos.

É neste contexto que este estudo retrospectivo, teve como objetivo determinar a ocorrência de *scrapie* em Portugal nas suas diferentes estirpes, antes de 2002, correspondente ao início da Vigilância Ativa no espaço comunitário, usando uma técnica até à data não utilizada na deteção de PrP^{Sc} - a imunohistoquímica.

Embora a amostragem de animais consistisse numa população de risco, visto que apresentavam sinais clínicos do foro neurológico, a amostragem de 155 animais poder-se-á considerar reduzida para detetar esta afeção, que é de baixa prevalência e que, em Portugal entre 2003 e 2008, foi de 0.0874% (Orge et al., 2010). Curiosamente, no âmbito da Vigilância Passiva para as TSEs (plano que inclui todos os animais que apresentem um quadro clínico suspeito de *scrapie*), todos os pequenos ruminantes considerados suspeitos clínicos não evidenciaram perfil lesional nem deposição de PrP^{Sc} (dados não publicados). Todos os casos positivos de *scrapie* têm vindo a ser detetados no âmbito da Vigilância Ativa, sem aparente manifestação de sinais clínicos evidentes, apesar da intensidade de deposição de PrP^{Sc} observada em alguns casos ser muito intensa, como se pôde constatar nos cortes dos controlos positivos utilizados no presente estudo. Desconhece-se o mecanismo pelo qual são desencadeados os sinais clínicos destas doenças. Todavia, nos inquéritos epidemiológicos efetuados, foi possível a descrição retrospectiva de sinais clínicos observados nalguns casos, sendo a ataxia, a perda de condição corporal e os tremores os sinais mais relatados (Orge et al., 2010).

Como diagnóstico diferencial para o *scrapie*, há a considerar várias outras afecções como: ectoparasitas, pseudorraiva (doença de Aujeszky), raiva, listeriose, pneumonia progressiva ovina (Maedi-Visna), cetose ovina, intoxicação por substâncias químicas ou plantas, e hipomagnesiémia.

De entre os cinco casos identificados como inconclusivos, 3 análises pertenciam à DRA do Alentejo (casos 1546/96, 10884/99 e 2475/99), região de Portugal mais afetada pelo *scrapie* atípico; a análise 11511/99 à DRA de Lisboa e Vale do Tejo e a análise 2219/99 à DRA do Centro, sendo que nestas regiões também estão descritos casos de *scrapie* atípico,

Relativamente aos sinais clínicos, o caso 1546/96 era suspeito de fotossensibilidade e de encefalite pelo vírus Maedi-Visna, cujos resultados do exame histopatológico do SNC revelaram edema das células de Purkinje, neuronofagia e vacúolos e a pesquisa do vírus

resultou negativa. Os restantes casos eram suspeitos de *scrapie* e de listeriose, mas no exame histopatológico não foram observadas vacuolização característica de *scrapie* nem lesões de encefalite

Embora seja limitada a informação em relação à idade dos ovinos analisados, as duas idades registadas de 3 e 4 anos nos casos 10884/99 e 11511/99, respetivamente, são idades consideradas menos frequentes nos casos de *scrapie* atípico/Nor98, visto que esta forma de doença tem sido confirmada essencialmente em animais com idade superior a 5 anos. A incipiente imunomarcação observada nos presentes casos poderá corresponder a casos iniciais de deposição de PrP^{sc}.

Relativamente às explorações de origem destes ovinos, só foi possível efetuar rastreio no caso 1546/96 em cuja exploração não foi detetado nenhum caso de *scrapie* até à data.

Sabe-se também que a forma de *scrapie* mais prevalente no nosso país é o atípico, sendo que a banda de baixo peso molecular (< 14kD) observável na técnica de *Western Immunoblotting* para o *scrapie* atípico está associada a uma menor resistência à digestão pela proteinase K (PK). Assim, esta aparente fragilidade da PrP^{sc} comparada à da PrP^{sc} associada ao *scrapie* clássico poderá contribuir para uma perda de imunomarcação relacionada com o tempo de arquivo. Este aspeto foi previamente avaliado e demonstrou-se que a PrP^{sc} do *scrapie* atípico continua a ser detetável em blocos de parafina de arquivo, o mesmo não se verificando a partir de amostras de SNC que estejam fixadas em formol durante pelo menos 1 ano (Orge et al., 2009), pelo que a imunomarcação nestas amostras arquivadas não terá ficado comprometida pelo tempo de arquivo

A confirmação da imunomarcação observada e considerada inconclusiva nos 5 casos identificados neste estudo requererá a realização de ensaios de imunohistoquímica com mais anticorpos anti-PrP e ensaios de deteção de PrP^{sc} por *Western Immunoblotting* a partir de blocos de parafina e, eventualmente, ensaios de infecciosidade em murganhos, caso se observe algum perfil eletroforético indicativo de PrP^{sc}. Adicionalmente a caracterização destes casos poderá ser completada com a determinação dos génotipos do gene *prnp* e assim identificar se poderão corresponder a génotipos mais associados ao *scrapie* atípico.

2.5. Conclusão

Há registos de *scrapie* desde o ano de 1750 sob a forma de estudos retrospectivos com base em relatos de pastores ou dos seus empregados. A doença manteve-se alheia ao conhecimento dos veterinários durante os séculos XVIII e XIX, uma vez que os proprietários, por receio de perdas económicas, mantinham os surtos de *scrapie* encobertos. A transmissão da doença era abordada inicialmente pelos investigadores como sendo de origem hereditária, sexualmente transmissível ou infetocontagiosa. Após a demonstração do *scrapie* como doença transmissível em 1936, o agente infeccioso, o prião, é identificado 70 anos depois.

Na amostragem analisada, embora limitada para uma doença de baixa prevalência, foi detetada uma imunomarcção sugestiva de PrP^{sc} da forma atípica de *scrapie* que requererá confirmação por outros métodos analíticos.

Tal como no Reino Unido, esta afecção já deveria existir antes de 1998, mas, atendendo às limitações das técnicas de diagnóstico associada à baixa prevalência e a um quadro clínico partilhado por outras doenças, não terá sido diagnosticada.

No caso de se confirmar como específica a imunomarcção detetada neste estudo, poder-se-á dizer que o *scrapie* atípico já existiria em Portugal antes de 2002, correspondendo o ovino 1546/96 ao mais antigo caso identificado.

Bibliografia

- Andréoletti O., Orge L., Benestad S.L., Beringue V. & Litaïse C, (2011). Atypical/Nor98 Scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog* 7(2), vol 7, issue 2, 1-13.
- Andréoletti O., Simon, S., Lacroux C., Morel N. & Tabouret G., (2004). PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nature Medicine*, 10, nº6, 591-593.
- Arsac J.N., Andréoletti O., Bilheude J.M., Lacroux C., Benestad S.L. & Baron T.(2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway, *Emerg Infect Dis*, 13(1), 58-65.
- Arsac J.N., Bétemps D., Morignat E., Féraudet C., Bencsik A (2009). Transmissibility of Atypical Scrapie in Ovine Transgenic Mice: Major Effects of Host Prion Protein Expression and Donor Prion Genotype. [versão electrónica], *PLoS ONE* 4 (10), Acedido em junho 23, 2013 em <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007300>.
- Bardill J.P., Dulle J.E., Fisher J.R. & True H.L. (2009). Requirements of Hsp104p activity and Sis1p binding for propagation of the [RNQ+] prion. *Prion*, Jul, 3(3), 151-60.
- Benestad L., Arsac J.N., Goldmann W. & Nöremark M.(2008). Atypical/Nor98 Scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet. Res.*, 39:19, 1-14.
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M. A. & Bratberg, B.(2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153, 202–208.
- Burkitt H. G., Young B. & Heath J. W. (1994). *Wheater Histologia Funcional* (terceira edição), Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 112-138.
- Buschmann A., Biacabe G., Ziegler U. & Benesik A. (2004). *Journal of Virological Methods*, 117, 27-36.
- Bruce M.E., Nonno R., Foster J., Goldmann W., Di Bari M., Esposito E., Benestad S. L., Hunter N & Agrimi U. (2007). Nor 98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. *Vet Rec*, 160, 665-666.
- Chesebro B. (2003). Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases, *British Medical Bulletin*, 66, 1-20.
- Cohen F. E., (1994), Structural clues to prion replication, *Science*, 264, 530-531.
- Del Rio Vilas V. J., Vink W. D. & Hubbard R.(2010). A case-control study of atypical scrapie in GB flocks, *Preventive Veterinary Medicine*, 96, 241-251.
- Defra, Department for Environment, Food & Rural Affairs (2012).[versão electrónica] acedido em junho 8, 2012.
- Donne D. G., Viles, J. H., Groth D., Mehlhorn, T.I., James, L., Cohen, F. E., Prusiner S. B., Wright P. E. & Dyson H. J., (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29-231): The N-Terminus is highly flexible [abstract] *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol 94:25, 13452-13457.

- Dustan B. H., Spencer Y. I., Casalone C., Brownlie J. & Simmons M. M.(2008), A histopathologic and immunohistochemical review of archived UK caprine scrapie cases, *Vet Pathol*, 45, 443-454.
- Comissão Europeia (2013 Regulamento nº 630/2013 da Comissão, de 28 de junho de 2013,[versão electrónica] acessido em outubro 2013 em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:179:0060:0083:PT:PDF>
- EFSA, European Food Safety Authority (2005). Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs). ,[versão electrónica] acessido em Novembro 23, 2012 em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:179:0060:0083:PT:PDF>
- Espinosa J.C., Herva M.E., Andréoletti O., Padilla D., Lacroux C., Cassard H., Lantier I., Castilla J. & Torres J.M. (2009). Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie [versão electrónica], CDC, Acessido em junho 12, 2013 em http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/8/08-1218_article.htm.
- Fediaevsky A., Gasqui P., Calavas D., Goudarzi K.M., Laurent P., Arzac J.N., Ducrot C. & Moreno C. (2008). Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie. *Rev Med Vet*, 6, 348-356.
- Fediaevsky A., Gasqui P., Calavas D. & Ducrot C. (2010). Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under french TSE control measures *The Veterinary Journal*, 185, 338-340.
- Fediaevsky A., Maurella C., Noremark M., Ingravaille F., Thorgeirsdottir S. & Orge L. (2010). The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 european countries, *BMC Veterinary research*, 6:9.
- Fernandez-Bellot E. & Cullin C. (2001), The protein-only theory and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the prions and the propagons, *Cell Mol life Sci*, 58 812-13), 1857-1878.
- Glatzel M., Giger O., Braun N. & Aguzzi A. (2004). The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases.*Curr Mol Med*, 4 (4), 355-359.
- Götte D. R., Benestad S. L., Laude H., Zurbringer A. & Oevermann A. (2011). Atypical scrapie isolates involve a uniform prion species with a complex molecular signature, *PLoS ONE*, 6 (11),1-10.
- Griffiths P., Spiropoulos J., Lockey R., Tout A. C., Jayasena D. & Plater J. M. (2010). Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice, *Journal of General Virology*, 91, 2132-2138.
- Hope J., Wood S. C., Birkett C. R., Chong A., Bruce M.E., Cairns D., Goldmann W., Hunter N.& Bostock C. J. (1999). *J Gen Virol*, 80 (Pt 1), 1-4.
- Keh-Ming P., Baldwin M., Nguyen J., Garret M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Flatterick R. J. & Cohen F. E. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Biochemistry*, 90, 10962-10966.

- Kittelberger R., Chaplin M. J., Simmons M. M., Ramirez-Villaescusa, McIntyre L. & Stuart C. (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 863-875.
- Konold T., Bone G., Simmons M.M., Dexter G., Moore S.J., Pettitt R.C. (2007). Scrapie in Goats. *Vet Rec*, Sep 15, 161 (11), 395-396.
- Lacroux C., Simon S., Benestad S. L., Maillet S., Mathey J., Lugan S. & Corbière F. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie, *PloSPathog*, 4 (12),1-11.
- Le Dur A., Béringue V., Andrèoletti O., Reine F., Laï T. L., Bratberg B., Vilotte J.L., Sarradin P., Benestad S.L. & Laude H.(2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes, *PNAS*, 102 (44), 16031-16036.
- Lühken G., Buschmann A., Brandt H., Eiden M., Groschup M.H., Erhardt G. & Martin H. (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases, *Vet Res*, 38, 65-80.
- Manson J., West J. D., Thomson V., McBride P., Kaufman M. H. & Hope J.(1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?, *Development*, 115, 117-122.
- Mazza M., Iulini B., Vaccari G., Acutis P. L., Martucci F., Esposito E., Peletto S. & Barocci S. (2010). Co-existence of classical and Nor98 in a sheep from an italian outbreak, *Research in Veterinary Science*, 88, 478-485.
- McKinley M. P., Bolton D. C., Prusiner S.B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion, *Cell*, Nov., 35(1), 57-62.
- Mead S., Poulter M., Uphill J., Beck J., Whitfield J., Webb T. E.F., Campbell T., Adamson G., Perigiotis P., Tabrizi S., Hummerich H., Verzilli C., Alpers M., Whitaker J. C. & Collinge J. (2009). *Lancet Neurol* 8(1), 57-66.
- Mitchell G.B., O' Rourke K., Harrington N.P., Soutyrne A., Simmons M.M., Dudas S., Zhuang D., Laude H., Balachandran A. (2010). Identification of atypical scrapie in Canadian sheep, *J Vet Diagn Invest*, 22 (3), 408-411.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases, *J Gen Virol*, 86 (Pt1), 231-235.
- Moser M., Colello R. J., Pott U. & Oesh B. (1995).Developmental expression of the prion protein gene in glial cells, *Neuron*, 14, 509-517.
- Brown D. R., Qin K. F., Herms J. W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P. E., Kruck T., Vonbohlen A. & Schulzschaefer H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo, *Nature*, 684-687.
- Orge L., Galo A., Machado C., Lima C., Ochoa C., Silva J., Ramos M. & Simas J.P. (2004).Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal, *Journal of General Virology*, 85, 3487-3491.

- Orge L. (2005) Caracterização da estirpe de BSE em Portugal e estudo da susceptibilidade genética dos ovinos ao scrapie, Dissertação de Doutoramento. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Orge L., Oliveira A., Machado C., Lima C., Ochoa C., Silva J. & Carvalho R. (2010). Putative emergence of classical scrapie in a background of enzootic atypical scrapie, *Journal of General Virology*, 91, 1646-1650.
- Orge L., Acín, C., González, L., Siso, S., Monleón E., Casalone, C., Lulini, B., Badiola J.J. Gavier-Widen, D. & Benestad, S.L. (2009). Effect of long term fixation in the immunohistochemical detection of PrP^{res} in atypical scrapie. Prion 2009. *Book of abstracts*, 23-25 setembro, Porto Carras, Grécia
- Pongolini S., Bergamini F., Iori A., Migliori S., Corradi A., Bassi S. (2009). Prion Protein genotypes of italian sheep breeds with lysine-171 and phenylalanine-141 detection. *Vet Microbiol.*, May 28, 137 (1-2), 18-23.
- Prusiner S.B. (1992). Chemistry and Biology of Prions. *Biochemistry*, Dec., 12277-12288.
- Prusiner S. B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis, *Science* 278, 245-251.
- Reed T. E., Waples R. S., Schindler D. E., Hard, J. J. & Kinnison M. T. (2010). Phenotypic plasticity and population viability the importance of environmental predictability [versão electrónica], *Proceedings of the Royal Society*, Acedido em julho 27, 2013 em <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/277/1699/3391.full>.
- Rivera-Milla E., Oidtmann B., Panagiotis C.H., Baier M., Sklaviadis T., Hoffmann R., Zhou Y., Solis G.P., Stuermer C.A. & Málaga Trillo E. (2006). Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *FASEB J.*, Feb., 20(2), 317-9.
- Saunders G.C., Cawthraw S., Mountjoy S.J., Hope J. & Windl O. (2006). PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain, *J Gen Virol*, 87 (Pt1), 3141-3149.
- Schneider K., Fangerou H., Michaelsen B., Wolfgang H. & Raab M. (2008). The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie, *Brain Research Bulletin*, 77, 343-355.
- Seuberlich T., Botteron C., Benestad S. L., Brünisholz H., Wyss R. & Kihm U. (2007). Atypical scrapie in a swiss goat and implications for transmissible encephalopathy surveillance, *J Vet Diagn Invest*, 19, 2-8.
- Simmons M. M., Moore S. J., Konold T., Thurston L., Terry L. A. & Thorne L. (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep, *Emerging Infectious Diseases*, 17 (5), 848-854.
- Simmons M. M., Konold T., Simmons H. A., Spencer Y. I., Lockey R. & Spiropoulos J. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep, *BMC Veterinary Research*, 3:20, 1-7.
- Simmons M. M., Konold T., Thuton L., Bellworthy S. J., Chaplin M. J. & Moore S. J. (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep, *BMC Veterinary Research*, 6:14, 1-10.

- Sofianidis G., Psychas V., Billinis C., Spyrov V., Argyrovdis S. & Vlemmas I. (2008). Atypical PrP^{sc} distribution in goats naturally affected with scrapie, *J Comp Pathol*, 138 (2-3), 90-101.
- Tanaka M., Chien P., Yonekura K. & Weissman J. S.(2005). Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins, *Cell*, 21(1), 49-62.
- Tranulis M.A., Benestad S.L., Baron T., Kretzshmar H. (2011). Atypical prion diseases in humans and animals.*Top Curr Chem*, 305, 23-50.
- Terry L. A., Howells L., Bishop K., Baker C. A., Everest S. & Thorne L. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie, *Veterinary research*, 42:65,1-20.
- Webb P. R., Powell L., Denyer M., Marsh S., Weaver C. & Simmons M.M. (2009). A retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987, *J Vet Diagn Invest*, 21, 826-829.
- Wemheuer W. M., Benestad S. L., Wrede A., Schulze-Sturm, Wemheuer W.E., Hahmann U. & Gawinecka J. (2009). Similarities between forms of sheep scrapie and creutzfeldt-jacob disease are encoded by distinct prion types, *The American Journal of Pathology*, 175, 2566-2573.
- Westergard L., Cristensen H. M. & Harris D. A. (2007).The cellular prion protein (PrP^c): Its physiological function and role in disease, *BBA – Molecular Basis of Disease*, 1772:6, 629-644.
- Yokoyama T., Masugin K., Schmerr M. J., Yujing S., Okada H., Iwamaru Y. & Imamura M., (2010). Intraspecies Prion Transmission Results in Selection of Sheep Scrapie Strains [versão electrónica]. In J. C. Bartz (Ed), *US National Library of Medicine*, 16. November 2010, Acedido em Fev. 15 2013 em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2982847/>.

ANEXO

Tabela 14- Descrição da amostragem utilizada neste estudo retrospectivo

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
17-05-1995	3863	17	ovino		
27-12-1995	10509	9	ovino		
24-01-1996	1133	2	ovino	Encefalite	
25-01-1996	342	8	ovino		
01-01-1996	1546	11	ovino	Maedi visna negativo	VX75A
01-02-1996	1542	8	ovino	Oestrus ovis	VX75A
15-02-1996	2062	12	ovino		VX24C
21-02-1996	2667	13	ovino	Maedi visna negativo	
23-04-1996	4145	3	ovino	Cenurose cerebral	
24-04-1996	5087	13	ovino	Maedi visna positivo, alcalóides positivo	
21-05-1996	5089	12	ovino	Alcalóides negativo, doseamento Cu 7.82 mg/Kg	VW82E
21-05-1996	5091	13	ovino	Maedi visna positivo	
21-05-1996	5361	14	ovino	Alcalóides negativo, doseamento Cu 7.82 mg/Kg	
24-02-1997	1500	4	ovino		
21-03-1997	2224	4	ovino		

Tabela 14- Descrição da amostragem utilizada neste estudo retrospectivo (continuação)

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
18-04-1997	3012	12	ovino		
17-04-1998	3980	3	ovino		
07-08-1998	6873	2	ovino		
18-09-1998	7796	2	ovino	Inconclusivo	
02-02-1999	1283	5	ovino		
19-02-1999	1458	4	ovino		
12-03-1999	2215	10	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
12-03-1999	2216	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-03-1999	2218	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-03-1999	2219	3	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-03-1999	2221	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-03-1999	2222	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
18-03-1999	2380	14	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
19-03-1999	2474	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
19-03-1999	2475	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
19-03-1999	2476	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
19-03-1999	2477	3	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
19-03-1999	2478	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
29-03-1999	2756	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
12-04-1999	3037	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-04-1999	3038	10	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-04-1999	3039	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-04-1999	3040	15	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
12-04-1999	3041	15	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
15-04-1999	3197	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
15-04-1999	3199	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
15-04-1999	3201	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
15-04-1999	3202	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
15-04-1999	3203	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
15-04-1999	3204	10	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
15-04-1999	3205	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
15-04-1999	3206	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
22-04-1999	3437	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
22-04-1999	3438	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
22-04-1999	3439	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
2-04-1999	3440	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
22-04-1999	3441	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
22-04-1999	3442	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
22-04-1999	3443	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE	
22-04-1999	3444	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
22-04-1999	3445	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
22-04-1999	3447	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
22-04-1999	3448	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
24-04-1999	3489	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3573	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3574	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3576	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3577	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3578	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3579	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3580	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3581	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
28-04-1999	3582	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3782	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3783	5	caprino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3784	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3785	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
04-05-1999	3786	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3787	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3788	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3789	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3790	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3791	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3792	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-05-1999	3793	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3905	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3906	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3907	5	caprino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3908	5	caprino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3909	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3910	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
07-05-1999	3911	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4017	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4018	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4019	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4020	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
13-05-1999	4021	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4022	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4023	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4024	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4025	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
13-05-1999	4026	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4249	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4250	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4251	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4252	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4253	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4254	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4255	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
20-05-1999	4257	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
21-06-1999	5091	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
21-06-1999	5095	9	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
21-06-1999	5096	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
21-06-1999	5097	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
21-06-1999	5098	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
21-06-1999	5100	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-11-1999	9764	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-11-1999	9765	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-11-1999	9766	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-11-1999	9767	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
04-11-1999	9768	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
23-11-1999	10520	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
23-11-1999	10521	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10880	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10881	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10882	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10883	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10884	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10885	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10886	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10887	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10888	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
02-12-1999	10889	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e à listeriose	
09-12-1999	11157	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
09-12-1999	11158	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
09-12-1999	11159	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
09-12-1999	11160	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
09-12-1999	11161	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
10-12-1999	11278	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
10-12-1999	11279	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
10-12-1999	11282	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
10-12-1999	11284	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
10-12-1999	11285	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
13-12-1999	11283	5	ovino		
16-12-1999	11510	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
16-12-1999	11511	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
16-12-1999	11512	5	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
16-12-1999	11513	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
16-12-1999	11514	5	ovino		
22-12-1999	11774	5	ovino		
22-12-1999	11775	5	ovino	Histopatológico negativo para a listeriose	
22-12-1999	11777	5	ovino	Histopatológico positivo para a listeriose	
2-12-1999	11778	5	ovino		

Data de entrada	Número de análise	Número de blocos	Espécie	Resultados relevantes SNC	Exploração
19-03-2001	3069	10	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
19-03-2001	3070	12	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
19-03-2001	3071	4	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
15-03-2002	2585	2	ovino		
16-04-2002	3487	7	ovino	Histopatológico negativo ao TE e listeriose	
03-05-2002	3915	2	ovino		
05-06-2002	4676	10	ovino		